



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Gizella da Cunha Rodrigues

**Estudo de polimorfismos nos genes que codificam a aldosterona sintase e o angiotensinogênio e relações de ancestralidade de pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica e não isquêmica**

Rio de Janeiro

2020

Gizella da Cunha Rodrigues

**Estudo de polimorfismos nos genes que codificam a aldosterona sintase e o angiotensinogênio e relações de ancestralidade de pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica e não isquêmica**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Dayse Aparecida da Silva

Coorientador: Dr. Ricardo Mourilhe Rocha

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

R696 Rodrigues, Gizella da Cunha.  
Estudo de polimorfismos nos genes que codificam a aldosterona sintase e o angiotensinogênio e relações de ancestralidade de pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica e não isquêmica / Gizella da Cunha Rodrigues – 2020.  
87 f.

Orientadora: Dayse Aparecida da Silva.  
Coorientador: Ricardo Mourilhe Rocha.  
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Programa de Pós-graduação em Biociências.

1. Insuficiência cardíaca - Teses. 2. Polimorfismo (Genética) - Teses. 3. Aldosterona – Teses. 4. Sistema renina-angiotensina - Teses. 5. Angiotensinogênio - Teses. 6. Linhagem – Teses. I. Silva, Dayse Aparecida da. II. Rocha, Ricardo Mourilhe. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 575.111:616.12-008.315

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Gizella da Cunha Rodrigues

**Estudo de polimorfismos nos genes que codificam a aldosterona sintase e o angiotensinogênio e relações de ancestralidade de pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica e não isquêmica**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de abril de 2020.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Dayse Aparecida da Silva  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientador: Dr. Ricardo Mourilhe Rocha  
Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ

▪ Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof. Dr. Denilson Campos de Albuquerque  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Teresa de Souza Fernandez  
Instituto Nacional de Câncer

Rio de Janeiro

2020

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois sem Ele eu não seria ninguém. Ele quem me concede o fôlego de vida e quem abriu todos os caminhos e oportunidades que me trouxeram até aqui.

Agradeço aos meus orientadores Prof.<sup>a</sup> Dra. Dayse Aparecida da Silva e Dr. Ricardo Mourilhe Rocha, pelo papel fundamental na elaboração desse trabalho e pelo apoio excepcional.

Aos meus queridos e amados pais Sueli Maria da Cunha Rodrigues e José Carlos Russo Rodrigues, que sempre me apoiaram em cada escolha e momento de conflito, eu também dedico todo a minha gratidão.

De igual modo dedico meu agradecimento ao meu amado marido Bruno Pereira Garcia, por ter estado sempre ao meu lado, com muito carinho e compreensão.

Agradeço a minha colega Yasmin Rollemberg, por ter me auxiliado nos experimentos ao longo do projeto. Tudo que eu sei de laboratório tem a sua participação. Mas também gostaria de dedicar minha gratidão a todos os demais colegas do Laboratório de Diagnóstico por DNA da UERJ que já me ajudaram direta ou indiretamente durante esse período.

O presente trabalho foi financiado com o apoio do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) e da Pós-Graduação em Biociências. E por fim, muito obrigada a todos que contribuíram para minha formação.

## RESUMO

RODRIGUES, Gizella da Cunha. **Estudo de polimorfismos nos genes que codificam a aldosterona sintase e o angiotensinogênio e relações de ancestralidade de pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica e não isquêmica.** 2020. 87f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A Insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica e multifatorial caracterizada pela incapacidade do coração em bombear o sangue, fazendo-o somente sob elevadas pressões de enchimento e comprometendo as necessidades metabólicas tissulares do organismo. Apesar dos avanços terapêuticos, a IC continua sendo uma das principais causas de mortalidade, internação hospitalar e limitação funcional no país e no mundo. O sistema renina-angiotensina-aldosterona representa um possível alvo para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da insuficiência cardíaca (IC), bem como em sua multiplicidade de manifestações fenotípicas. O presente estudo teve como principal objetivo investigar a distribuição das frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos relacionados com a produção de aldosterona (gene *CYP11B2*) - rs3802228 A>G, rs3097 C>T - e angiotensinogênio (gene *AGT*) - rs699 A>G e rs3789678 C>T - em uma coorte de pacientes com IC e indivíduos sem o histórico da doença e investigar sua associação com a presença de IC. A ancestralidade genômica dos indivíduos incluídos no estudo também foi determinada para excluir associações espúrias. O estudo incluiu 247 indivíduos de ambos os sexos atendidos no ambulatório de IC, dos quais 117 IC isquêmica (IC-I) e 130 não isquêmica (IC-NI). Além disso, 122 amostras provenientes de voluntários saudáveis foram genotipadas. As amostras de DNA foram extraídas pela técnica de salting-out e genotipadas pelos sistemas PCR e SnapShot Multiplex. A média de idade dos pacientes foi de  $64,8 \pm 13,8$  anos e a dos indivíduos saudáveis de  $39,9 \pm 11,6$ . O alelo T do polimorfismo rs3097 demonstrou associação significativa com IC isquêmica e não isquêmica em indivíduos de ancestralidade europeia (I-HF = 0,02, NI-HF =  $4 \times 10^{-4}$ ) e com IC isquêmica em indivíduos miscigenados ( $p = 8 \times 10^{-4}$ ). Este trabalho contribuiu para a caracterização dos polimorfismos rs3097, rs3802228, rs699 e rs3789678 na população brasileira, mais especificamente do Rio de Janeiro, e para a associação destes polimorfismos com a IC, contando com o auxílio de ferramentas moleculares de ancestralidade para a eliminação de associações espúrias. Os resultados evidenciaram associações sugestivas do polimorfismo rs3097 C>T, presente no gene da aldosterona sintase, com o quadro de IC, seja isquêmica ou não isquêmica.

Palavras-chave: Insuficiência cardíaca. Aldosterona. Sistema-renina-angiotensina-aldosterona. Aldosterona sintase. Angiotensinogênio. Polimorfismos genéticos. Ancestralidade genômica.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Gizella da Cunha. **Study of polymorphisms in aldosterone synthase and angiotensinogen genes and ancestral relationships of patients with ischaemic and non-ischaemic heart failure.** 2020. 87f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Heart failure (HF) is a clinical and multifactorial syndrome characterized by the inability of the heart to pump blood and meet metabolic tissue needs. Despite therapeutic advances, HF remains one of the main causes of mortality, hospitalization and functional limitations in the country and in the world. The renin-angiotensin-aldosterone system is a possible target for better understanding the mechanisms involved in HF development and its multiple clinical outcomes. The present study aimed to investigate the distribution of allelic and genotypic frequencies of polymorphisms related to aldosterone (*CYP11B2* gene) - rs3802228 A>G, rs3097 C>T - and angiotensinogen (*AGT* gene) production - rs699 A>G e rs3789678 C>T- in a cohort of patients with HF and individuals without the history of the disease and investigate its association with the presence of HF. Genomic Ancestry were also determined to exclude spurious associations. The study included 247 individuals of both sexes attended at the HF outpatient clinic, of which 117 with ischemic HF (I-HF) and 130 with non-ischemic HF (NI-HF). In addition, 122 samples from healthy volunteers were genotyped. DNA samples were extracted by salting-out technique and genotyped by PCR and SnapShot Multiplex systems. The mean age of patients was  $64,8 \pm 13,8$  years and healthy subjects  $39.9 \pm 11.6$ . The T allele of the rs3097 polymorphism demonstrated a significant association with both ischaemic and non-ischaemic HF in individuals of European (I-HF=0.02, NI-HF= $4 \times 10^{-4}$ ) and with ischaemic HF in individuals of admixed ( $p=8 \times 10^{-4}$ ) ancestry. This work contributed to the characterization of the rs3097, rs3802228, rs699 and rs3789678 polymorphisms in the Brazilian population, more specifically in Rio de Janeiro, and to the association of these polymorphisms with HF, with the help of ancestral molecular tools to eliminate associations spurious. The results showed suggestive associations of the rs3097 C>T polymorphism, present in the aldosterone synthase gene, with both ischaemic and non-ischaemic HF.

Keywords: Heart failure. Aldosterone. Renin-angiotensin-aldosterone-system. Aldosterone synthase. Angiotensinogen. Genetic polymorphisms. Genomic ancestry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Panorama da insuficiência cardíaca (IC) no Brasil e no mundo.....	14
Figura 1 -	O sistema renina-angiotensina-aldosterona .....	17
Figura 2 -	Localização do gene <i>CYP11B2</i> no cromossomo 8 e alguns exemplos de polimorfismos.....	19
Figura 3 -	Localização do gene <i>AGT</i> no cromossomo 1 e alguns exemplos de polimorfismos.....	21
Figura 4 -	Regulação da expressão gênica por miRNAs.....	23
Quadro 2 -	Informações dos SNPs empregados no estudo.....	30
Quadro 3 -	Primers nos sentidos forward (F) e reverse (R) para amplificação.....	33
Quadro 4 -	Sequências dos primers de extensão.....	34
Quadro 5 -	Primers utilizados para a amplificação dos AIM-InDels.....	36
Figura 5 -	Gel de poliacrilamida 10% indicando os produtos de amplificação dos marcadores estudados.....	42
Figura 6 -	Eletoferograma com multiplex concernente a amostra pertencente ao grupo controle.....	43
Figura 7 -	Eletoferograma demonstrando o rs3097 C>T.....	43
Figura 8 -	Eletoferograma demonstrando o rs3802228 A>G.....	43
Figura 9 -	Eletoferograma demonstrando o rs699 A>G.....	43
Figura 10 -	Eletoferograma demonstrando o rs3789678 C>T.....	44
Figura 11 -	Perfil de ancestralidade dos indivíduos pertencentes ao grupo de pacientes com IC.....	54
Figura 12 -	Perfil de ancestralidade dos indivíduos pertencentes ao grupo de indivíduos controles.....	55
Figura 13 -	Leitura de eletroforese em capilar dos marcadores AIMs.....	56



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados demográficos, clínicos e de ancestralidade dos indivíduos saudáveis e pacientes incluídos no estudo.....	41
Tabela 2 -	Distribuição das frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos selecionados nos genes <i>CYP11B2</i> e <i>AGT</i> em pacientes isquêmicos, não isquêmicos e controles.....	45
Tabela 3 -	Valores de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética $F_{st}$ das frequências genótípicas dos polimorfismos selecionados nas populações de casos e controle.....	46
Tabela 4 -	Comparação da distribuição genotípica dos polimorfismos selecionados entre os grupos estudados.....	47
Tabela 5 -	Comparação da distribuição genotípica dos polimorfismos selecionados entre os grupos estudados.....	47
Tabela 6 -	Valores de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética $F_{st}$ das frequências genótípicas dos quatro polimorfismos selecionados nas populações de casos estratificados por ancestralidade.....	48
Tabela 7 -	Valores de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética $F_{st}$ das frequências genótípicas dos polimorfismos selecionados em pacientes estratificados por sexo.....	48
Tabela 8 -	Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs3097 C>T e resultados dos testes de associação entre os grupos.....	50
Tabela 9 -	Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs3802228 A>G e resultados dos testes de associação entre os grupos.....	51
Tabela 10 -	Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs699 A>G e resultados dos testes de associação entre os grupos.....	52
Tabela 11 -	Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs378978 C>T e resultados dos testes de associação entre os grupos.....	53
Tabela 12 -	Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs3097 C>T e resultados dos testes de associação entre os grupos de ancestralidade europeia.....	59

Tabela 13 -	Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs3097 C>T e resultados dos testes de associação entre os grupos de ancestralidade africana.....	60
Tabela 14 -	Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs3097 C>T e resultados dos testes de associação entre os grupos de ancestralidade miscigenada.....	61
Tabela 15 -	Associação do alelo T do polimorfismo rs3097 C>T com as formas graves e não graves da IC.....	62
Tabela 16 -	Associação do alelo T do polimorfismo rs3097 C>T com o índice de óbitos entre os pacientes.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM	<i>Ancestry Informative Marker</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAC	Doença arterial coronariana
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IC	Insuficiência cardíaca
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
InDel	Polimorfismo de inserção / deleção
miRNA	Micro RNA
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
OR	<i>Odds ratio</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor que
mL	Mililitro
mM	Milimolar
μL	Microlitro
mg	Miligrama
°C	Graus Celsius
M	Molar
μg	Micrograma
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
<i>p</i>	“p” valor
±	Mais ou menos
=	Igual a
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de amônio
KHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de potássio
EDTA	<i>Ethilenediamine tetracetic acid</i> - Ácido etilenodiamino tetra-acético
TE	Tampão Tris EDTA
NaCl	Cloreto de sódio

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	26
1.1	<b>Geral</b> .....	26
1.2	<b>Específicos</b> .....	26
2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
2.1	<b>Amostras</b> .....	27
2.1.1	<u>Amostras de pacientes com IC</u> .....	28
2.1.2	<u>Amostras de indivíduos controle</u> .....	29
2.2	<b>Extração do DNA</b> .....	29
2.3	<b>Genotipagem dos polimorfismos SNPs</b> .....	30
2.3.1	<u>Desenho dos primers de amplificação e extensão</u> .....	31
2.3.2	<u>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</u> .....	31
2.3.2.1	Teste dos primers.....	31
2.3.2.2	PCR Multiplex.....	32
2.3.3	<u>Reação de extensão de nucleotídeo único por SNaPshot</u> .....	33
2.4	<b>Reação de sequenciamento</b> .....	34
2.5	<b>Estimativa de ancestralidade por AIMs-InDels</b> .....	35
2.6	<b>Análises estatísticas</b> .....	37
3	<b>RESULTADOS</b> .....	39
3.1	<b>Análise demográfica dos grupos estudados</b> .....	39
3.2	<b>Análises moleculares</b> .....	42
3.2.1	<u>Equilíbrio de Hardy-Weinberg</u> .....	44
3.2.2	<u>Comparação das frequências dos polimorfismos entre grupos</u> .....	46
3.3	<b>Testes de associação dos polimorfismos estudados</b> .....	49
3.4	<b>Identificação dos perfis de AIMs-InDels</b> .....	54
3.5	<b>Relações de ancestralidade e polimorfismos com associação</b> .....	57
3.5.1	<u>Polimorfismo rs3097</u> .....	57
3.5.1.1	Associações do polimorfismo rs3097 com a gravidade da IC e com o índice de óbitos.....	62
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	63

<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pedro Ernesto para amostras de pacientes com IC-I.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pedro Ernesto para pacientes com IC-NI.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO C - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pedro Ernesto para amostras controles.....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO E - Documento do Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (SISNEP).....</b>	<b>87</b>

## INTRODUÇÃO

### A Insuficiência cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica e multifatorial caracterizada pela incapacidade do coração em bombear o sangue, fazendo-o somente sob elevadas pressões de enchimento e de forma a comprometer as necessidades metabólicas tissulares. Tal síndrome é o resultado de alterações cardíacas estruturais ou funcionais que culminam na redução do débito cardíaco e/ou em elevadas pressões de enchimento (MANN *et al.*, 2014)

Apesar dos avanços terapêuticos, a IC continua sendo uma das principais causas de mortalidade, internação hospitalar e limitação funcional no país e no mundo. No ano de 2012 houve cerca de 240 mil hospitalizações com diagnóstico de IC no Brasil (BRASIL, 2014). Com base nisso, pode-se inferir que a detecção precoce de indivíduos de alto risco e a prevenção são fundamentais para diminuir estes números.

Além disso, a IC é consideravelmente prevalente e promotora de notável redução tanto da qualidade como da expectativa de vida de seus portadores. O estudo *Brazilian Registry of Acute Heart Failure (BREATHE)* identificou uma mortalidade intra-hospitalar de 12,6%. Além disso, a IC é responsável por um custo apreciável em relação ao seu cuidado. Esse custo geralmente está associado com o número de hospitalizações, o qual independe do fenótipo de apresentação do paciente (ALBUQUERQUE *et al.*, 2015).

O número absoluto de casos de IC tem aumentado ao longo dos anos. Isso se deve por uma série de fatores, dentre os quais estão o envelhecimento da população, a melhor sobrevida após o infarto do miocárdio e às atuais estratégias de tratamento da IC (LOPEZ-SENDÓN; MONTORO, 2015). Os portadores desta condição podem apresentar um agravamento súbito dos seus sintomas, o que, por sua vez, dependendo da frequência com que ocorra, promove uma progressiva deterioração da função cardíaca e da qualidade de vida (GHEORGHIADE *et al.*, 2005). O Quadro 1 ilustra alguns aspectos epidemiológicos importantes relacionados com o impacto dessa condição na atualidade.

A IC surge quase que universalmente através de condições cardiovasculares pré-estabelecidas, como aterosclerose, cardiomiopatia, miocardite, malformações congênitas ou doença valvular. No entanto, o conhecimento do motivo pelo qual alguns pacientes com

essas condições apresentam alto risco de insuficiência cardíaca ainda não está completamente elucidado. Por conta disso, o estudo genético de polimorfismos de nucleotídeo único que podem aumentar os riscos de desenvolvimento da doença oferece uma alternativa bastante promissora para desvendar os mecanismos de desenvolvimento da IC (MORITA; SEIDMAN, J.; SEIDMAN, E. C. 2005).

Quadro 1 - Panorama da insuficiência cardíaca (IC) no Brasil e no mundo

1 em cada 5 adultos com idade > 40 anos terá IC
1 em cada 5 pacientes com IC morrerá dentro de 1 ano
3 dos maiores fatores de risco para IC vêm aumentando - idade, obesidade e diabetes
IC é a principal causa de internação no Brasil (SUS) em pessoas acima dos 60 anos
O risco de morte súbita em IC é de 6 a 9 vezes maior, quando comparado com a população sem IC
Existem 26 milhões de pessoas com IC em todo o mundo

Legenda: Sistema Único de Saúde (SUS).

Fonte: Adaptado de MESQUITA *et al.*, 2017.

A IC pode ser classificada de acordo com a fração de ejeção ventricular (FEVE), a gravidade dos sintomas e o tempo e progressão da doença. A terminologia usada para definir a IC baseada na FEVE compreende pacientes com fração de ejeção preservada ( $\geq 50\%$ ), com fração de ejeção intermediária ( $49\% \geq FEVE \geq 40\%$ ) e por último, com fração de ejeção reduzida ( $< 40\%$ ). A classificação de pacientes com IC de acordo com a FEVE é importante, uma vez que eles diferem em relação à etiologia da doença, às comorbidades associadas e, não obstante, à resposta à terapêutica (COMITÊ COORDENADOR DA DIRETRIZ BRASILEIRA DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CRÔNICA E AGUDA, 2018).

### Principais etiologias associadas à IC

A doença arterial coronariana (DAC) é uma das principais causas de IC no mundo (MOZAFFARIAN *et al.*, 2005). O estudo de Framingham (1993) indicou um aumento de 41% nos casos de IC por DAC a cada década em homens, e 25% em mulheres. Observa-se, portanto, a elevada importância no melhor conhecimento das bases fisiológicas e genéticas responsáveis pelo desenvolvimento dessa doença.



De acordo com a *World Health Organization* (WHO, 2016), o principal mecanismo fisiopatológico responsável pela DAC caracteriza-se pela insuficiência de irrigação sanguínea no coração em decorrência da obstrução das artérias coronarianas por placas ateroscleróticas. Ainda de acordo com a WHO os principais fatores de risco incluem dieta não saudável, sedentarismo, tabagismo, alcoolismo, dentre outros.

Acredita-se que a herdabilidade genética atribuída à DAC encontra-se em uma faixa de 40-60%, com base em resultados obtidos a partir de estudos familiares e de gêmeos (VINKHUYZEN *et al.*, 2013). Porém, a descoberta das bases genéticas dessa doença não tem sido uma tarefa fácil ao longo dos anos e os genes mais promissores para a realização de estudos clínicos são justamente aqueles envolvidos na codificação de proteínas que desempenham funções biológicas cruciais no sistema cardiovascular (McPHERSON; TYBJAERG-HANSEN, 2016).

Além da DAC, existem outros fatores que podem convergir para o desenvolvimento da IC. Esses fatores compõem um vasto grupo que produz como resultado a chamada “Insuficiência cardíaca não isquêmica”. Deve-se levar em consideração que a IC é um desfecho comum a uma variedade de doenças e portanto, algumas das principais causas dessa condição incluem a cardiomiopatia hipertensiva (LEVY *et al.*, 1990), alcoólica (BRIGDEN, 1974), idiopática (DEC; FUSTER, 1994), familiar (BATTERSBY; GLENNER, 1961), chagásica (MORRIS *et al.*, 1990), dentre outras.

### **Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)**

O sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) é um possível candidato para a compreensão dos mecanismos envolvidos na IC e na multiplicidade de suas manifestações fenotípicas. Isso se deve ao seu papel regulatório na função cardíaca, pressão cardíaca e homeostase hidroeletrólítica (GRIENDLING, 1993). Além disso, já foi identificada uma influência de elementos-chave como a angiotensina II (AII) (SADOSHIMA; ISUMO, 1993; ZAHER; ALI, 2017) e a aldosterona (HOROWITZ, 2004; WEBER, 2001; WEIR *et al.*, 2011) no desenvolvimento da insuficiência cardíaca.

O SRAA influencia a homeostase do sódio e da água, além do tônus vascular (RIGATTO *et al.*, 2004). Ele é constituído por um conjunto de proteínas fisiológicas, destacando-se a enzima renina (REN), o angiotensinogênio (AGT), a enzima conversora da

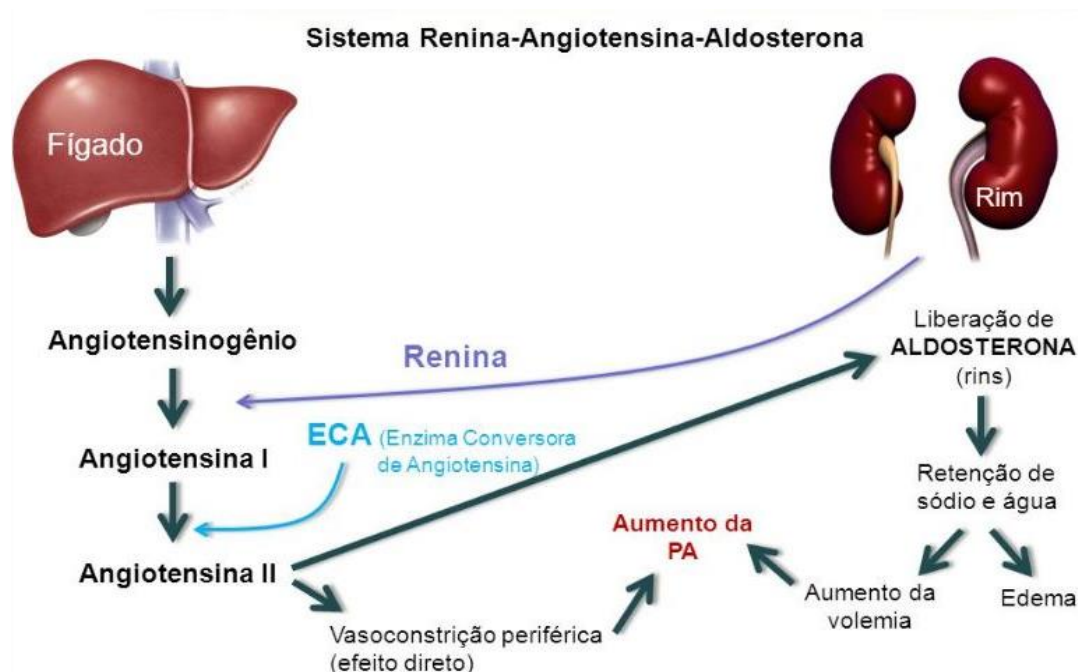
angiotensina (ECA), angiotensinas e aldosterona, além dos seus respectivos receptores (PATEL *et al.*, 2017). Todos os componentes do SRAA já foram encontrados em tecidos e órgãos como coração, cérebro, rins, glândulas adrenais, vasos sanguíneos e órgãos reprodutores (MARTELLI, 2010; RIGATTO *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2000).

O processo tem início com a renina, enzima proteolítica de origem sobretudo renal. Ela cliva o  $\alpha$ 2-globulina angiotensinogênio, produzido pelos hepatócitos, formando a angiotensina I (AI). A AI, por sua vez, é convertida em AII, um decapeptídeo vasopressor ativo, por ação da ECA (LIMA *et al.*, 2007; MARTELLI, 2010; RIGATTO *et al.*, 2004). A ECA, por sua vez, é oriunda principalmente dos epitélios capilares pulmonares, mas também pode ser encontrada no plasma e nos rins (ROGERSON *et al.*, 1992). A AII é um vasopressor altamente potente e é rapidamente degradada por angiotensinases nos leitos capilares periféricos (SANTOS *et al.*, 2012).

A produção de renina pelo aparelho justaglomerular é aumentada em estímulo a um conjunto de fatores. Dentre eles a diminuição da pressão arterial e da volemia, além de estimulação simpática e diminuição da carga de sódio no plasma, têm especial importância. Em contrapartida, uma elevação dos níveis plasmáticos de sódio, AII e/ou hormônio antidiurético inibem a liberação de renina (PERSSON, 2003; PATEL *et al.*, 2017).

O SRAA exerce uma notável influência na homeostase do sódio, potássio e água no organismo, através da produção final do hormônio Aldosterona no córtex suprarrenal, em estímulo à Angiotensina II. Desse modo, esse sistema de retroalimentação existente entre os elementos dessa via é capaz de contribuir para o controle da pressão arterial (SAMAVAT *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012) (Figura 1).

Figura 1- O sistema-renina-angiotensina-aldosterona



Nota: o sistema renina-angiotensina-aldosterona têm início com a liberação de renina pelo aparelho justaglomerular nos rins, a qual cliva o angiotensinogênio produzido e liberado pelo fígado em angiotensina I, que é convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina. A angiotensina II se liga a receptores no córtex da supra-renal estimulando a liberação de aldosterona. Tanto a angiotensina II como a aldosterona exercem ações fisiológicas que culminam no aumento da pressão arterial.

Fonte: ALLEPHARMA, 2018.

A aldosterona é um hormônio esteroide que exerce participação crucial na homeostase do sódio e da água sob condições fisiológicas. Níveis plasmáticos excessivos deste hormônio podem resultar em hipertensão (BROWN *et al.*, 1996; ROSSI *et al.*, 2008). Em adição ao importante papel da aldosterona na deflagração da hipertensão, ela também exerce influência direta sobre os cardiomiócitos, estimulando a fibrose cardíaca e o desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (LIJNEN; PETROV, 2000; WEBER, 2001; WEIR *et al.*, 2011).

Alguns estudos indicam que o uso de antagonistas de receptores da aldosterona, quando somado a tratamentos padrões, tem potencial de reduzir a morbidade e a mortalidade em pacientes com ICC (O'KEEFE *et al.*, 2007; PITT *et al.*, 1999). Portanto, a enorme influência exercida pela aldosterona sobre o sistema cardiovascular, torna a compreensão dos mecanismos de síntese deste hormônio imprescindível.

A aldosterona sintase, enzima codificada pelo gene *CYP11B2*, é um integrante-chave da via de síntese da aldosterona, sendo responsável pelas três últimas etapas dessa rota. Esta

enzima pertence ao complexo mitocondrial p450 e é responsável por catalisar duas reações de hidroxilação. Portanto, na ausência desta enzima, a aldosterona não pode ser produzida, e qualquer alteração deletéria pode influenciar significativamente a síntese deste hormônio e conseqüentemente, seus efeitos fisiológicos (HATTANGADY *et al.*, 2012).

### **Polimorfismos genéticos**

Os polimorfismos genéticos são alterações presentes em mais de 1% da população. Estudos envolvendo esses marcadores genéticos, por sua vez, podem ajudar a explicar diferenças primordiais na evolução clínica de uma variedade de doenças e nas diferentes respostas terapêuticas entre pacientes que apresentam a mesma patologia e que utilizam as mesmas medicações.

Com o advento do projeto genoma, acredita-se que aproximadamente 400 genes sejam responsáveis por regular processos vitais envolvendo a participação de biomoléculas. Além disso, Telenti *et al.* (2016) identificaram mais de 150 milhões de variantes únicas a partir do sequenciamento de dez mil genomas humanos. Tendo em vista esse fator, pode-se inferir que o uso de ferramentas de biologia molecular pode possibilitar a descoberta dos mecanismos causadores de várias doenças. (MCNAMARA *et al.*, 2003).

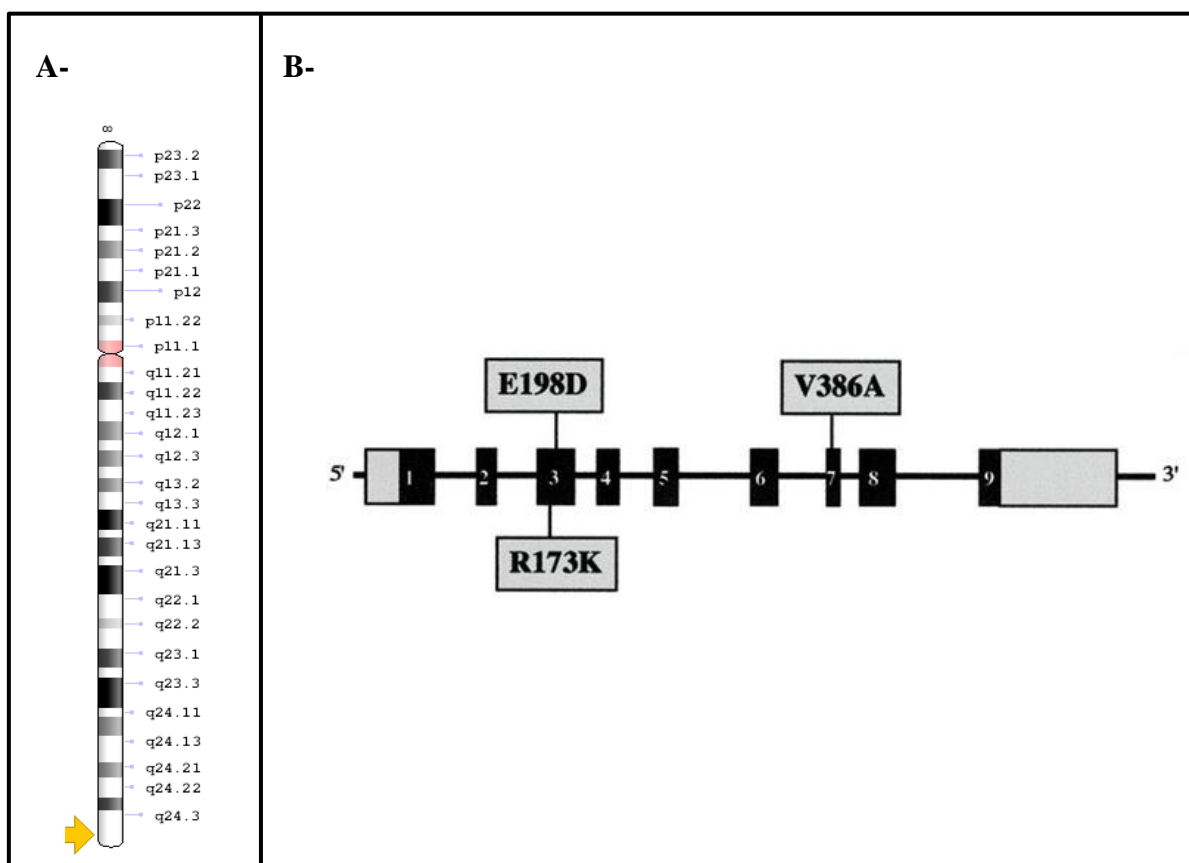
### **Polimorfismos do gene da Aldosterona Sintase (CYP11B2)**

O gene *CYP11B2* está localizado no braço longo do cromossomo 8, na região q24.3 (Figura 2A). Seu domínio se estende de 142,910,559 a 142,917,843 pares de bases (pb) (NCBI, acesso em: 27/03/2018). Ele é responsável por fornecer as instruções necessárias para a síntese da enzima aldosterona sintase, anteriormente conhecida como corticosterona metil-oxidase. (*Genetics Home Reference*, acesso em: 27/03/2018).

As principais mutações estudadas no gene *CYP11B2* estão associadas à inúmeras condições patológicas. Dentre as quais pode-se nomear a deficiência de corticosterona metiloxidase, hiperaldosteronismo familiar, além de outras condições cardiovasculares (AMIR *et al.*, 2008; CONNELL *et al.*, 2004; QUACK *et al.*, 2010; WHITE, 2004). A Figura

2B ilustra o gene da aldosterona e alguns exemplos de polimorfismos que podem ser encontrados neste gene.

Figura 2 - Localização do gene *CYP11B2* no cromossomo 8 e alguns exemplos de polimorfismos



Legenda: A – Localização cromossômica do gene *CYP11B2*; B - Ilustração das regiões codificantes e não codificantes do gene *CYP11B2*.

Nota: Os retângulos pretos representam os exons do gene *CYP11B2* e os cinzas as regiões reguladoras 5' e 3'UTR. A Figura também ilustra a posição de alguns dos principais polimorfismos existentes nesse gene.

Fonte: NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE, 2018a; PORTRAT-DOYEN, *et al.* 1998.

Recentemente, um estudo desenvolvido por JIA *et al.* (2014), contando com o auxílio de ferramentas computacionais de modelagem molecular, conseguiu prever uma possível associação deletéria sob a síntese da aldosterona, de um conjunto de polimorfismos. Dentre os que apresentam especial importância, estão quatro polimorfismos de nucleotídeo único presentes na região codificadora do gene (rs72554626 T>C, rs5317 A>C, rs146655862 C>A/C>T e rs5315 A>G/A>T ), além de oito presentes na região 3'UTR, destacando-se o rs3097 e o rs3802228, incluídos neste estudo. O rs3097 C>T também já foi relacionado com

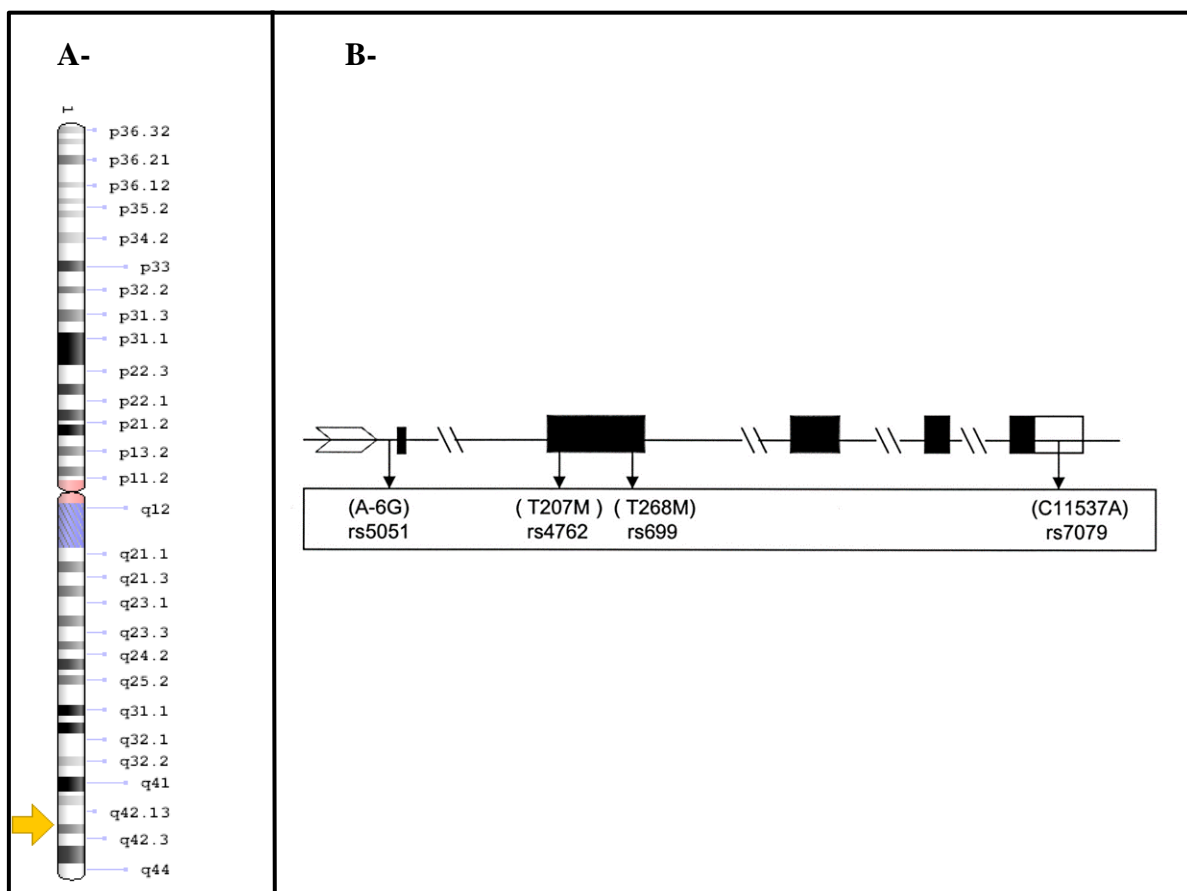
o espessamento do músculo cardíaco por Mayosi *et al.* (2003). Paralelamente, estudos também indicaram uma associação sugestiva do rs3802228 com outras patologias como a DAC (CAO *et al.*, 2009).

### **Polimorfismos do gene Angiotensinogênio (AGT)**

O gene *AGT* está localizado no braço longo do cromossomo 1, na região q42.2 (Figura 3A). Seu domínio se estende de 230,702,523 a 230,714,590 pb (NCBI, 2018). Esse gene fornece instruções para a síntese do angiotensinogênio. Aproximadamente seis variantes associadas a este gene estão relacionadas com a disgenesia tubular renal (GRIBOUVAL *et al.*, 2005; GUBLER; ANTIGNAC, 2009), caracterizada por um desenvolvimento anormal dos rins antes do nascimento, com a incapacidade em produzir urina e hipotensão severa. Além disso, outras variantes no gene *AGT* também estão relacionadas com determinadas condições patológicas que condicionam a uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de hipertensão (WATKINS *et al.*, 2010).

Dentre os polimorfismos de nucleotídeo único presentes nesse gene (Figura 3B) e que podem ter associação com doenças cardiovasculares, destaca-se o rs699 A>G e o rs3789678 C>T. O primeiro, é bastante consagrado na literatura em estudos de associação com a hipertensão arterial (TAKEUCHI *et al.*, 2012), porém ainda não há um consenso comprovando uma possível correlação do alelo G desse polimorfismo com a IC. O rs3789678 C>T, contudo, em especial o alelo T, foi correlacionado com a hipertensão gestacional (XUN *et al.*, 2016) e com a fibrilação atrial não familiar em populações chinesas (ZHAO *et al.*, 2015). Mas ainda são escassos ou inexistentes estudos de associação envolvendo esse SNP com doenças cardiovasculares, sobretudo com a IC. Justificando-se, portanto, sua inserção no presente estudo.

Figura 3 - Localização do gene *AGT* no cromossomo 1 e alguns exemplos de polimorfismos



Legenda: A – Localização cromossômica do gene *AGT*. B- Ilustração das regiões codificantes e não codificantes do gene *AGT*.

Nota: Os retângulos pretos representam os exons do gene *AGT* - Os retângulos marcados em preto simbolizam os exons do gene *AGT*. A Figura também ilustra a posição de alguns dos principais polimorfismos existentes nesse gene.

Fonte: NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE, 2018b; SU *et al.*, 2007.

### Regiões não traduzidas do mRNA e o papel dos miRNAs

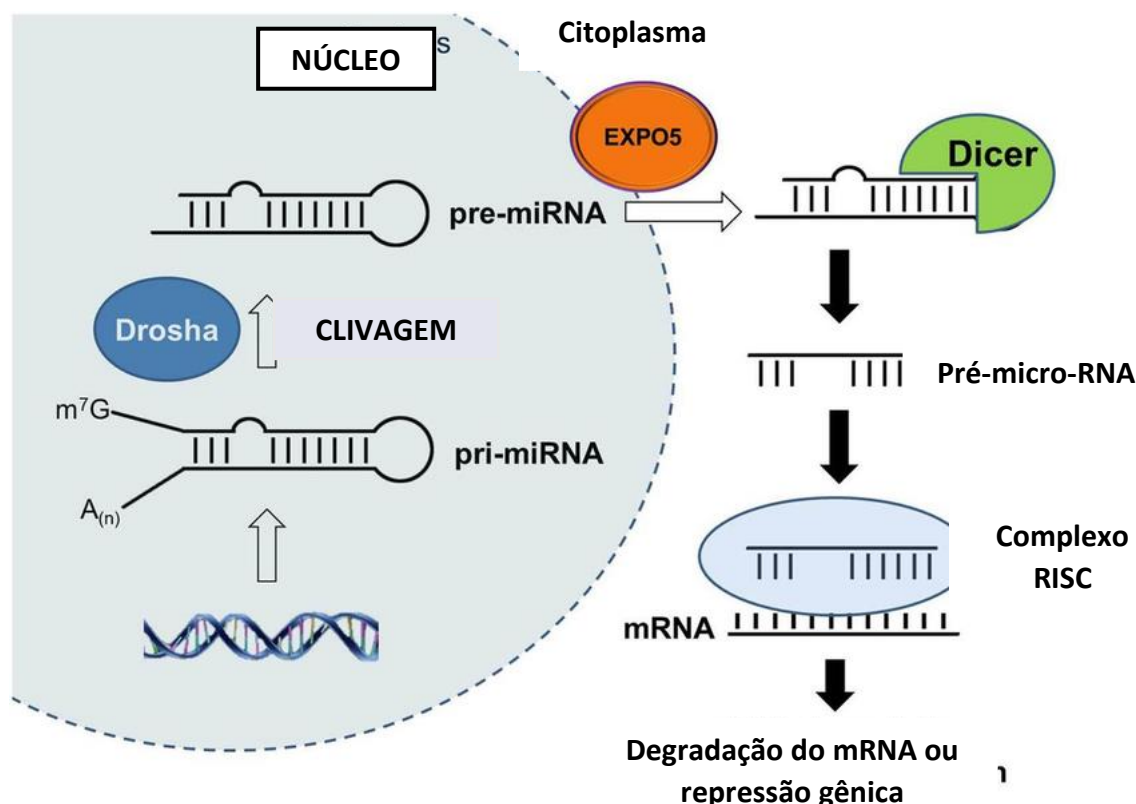
As regiões UTR, do inglês “*untranslated regions*” são regiões não traduzidas do mRNA que desempenham funções cruciais na regulação transcricional e pós-transcricional da expressão gênica. Algumas dessas funções incluem o transporte do mRNA para fora do núcleo, a manutenção da eficiência da tradução e a localização e estabilidade subcelular de proteínas (BASHIRULLAH *et al.*, 2001; JANSEN, 2001; JUNG; SUH, 2014; VAN DER VELDEN; THOMAS, 1999). Dentro do grupo de polimorfismos selecionados em nosso estudo, o rs3097C>T e o rs3802228 A>G se encontram nessas regiões.

A regulação exercida pelas regiões UTRs sobre o mRNA é mediada por vários fatores. Existem, por exemplo, padrões de nucleotídeos localizados nas regiões UTR 5' e UTR 3' que podem interagir com proteínas de ligação a RNA específicas. Também já foi demonstrado que as interações entre sequências específicas localizados nas regiões UTRs e RNAs não codificantes complementares desempenham papéis reguladores importantes (SWEENEY *et al.*, 1996; STERI *et al.*, 2018).

Os miRNAs são sequências de RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos que desempenham funções regulatórias tanto em animais como em plantas. Eles podem promover a repressão da tradução ou a degradação do mRNA (REINHART *et al.*, 2002). Quando um miRNA se alinha com o seu mRNA complementar, e começa a compor o complexo de silenciamento induzido por ácido ribonucleico (RISC - do inglês: *RNA-induced silencing complex*), um complexo proteico cujo principal componente é uma endonuclease, a clivagem será especificada pela intensidade da complementariedade entre o mRNA e a sequência interna da endonuclease (BARTEL, 2004; TAFRIHI; HASHEMINASAB, 2018). Por outro lado, o pareamento pode promover apenas a repressão da tradução gênica, ao impedir o reconhecimento do mRNA pelos ribossomos (CARTHEW, 2005). Dessa forma, é possível imaginar que a presença de polimorfismos genéticos nessas regiões UTR podem tanto criar sítios de ligação a miRNAs como extinguir sítios outrora existentes (GREGORY; SHIEKHATTAR, 2005). A Figura 4 ilustra a rota de síntese simplificada e a atuação desses miRNAs sobre a expressão gênica.



Figura 4 - Regulação da expressão gênica por miRNAs



Nota: Os microRNAs (miRNAs) são inicialmente transcritos pela polimerase II (Pol II) como transcritos de miRNA primário (pri-miRNA) que são processados pela Drosha para gerar pré-miRNAs. Os pré-miRNAs são exportados do núcleo para o citoplasma pela exportina 5 (EXPO5). O complexo Dicer é recrutado para interagir com os pré-miRNAs a fim de torná-los em miRNAs maduros, que são incorporados no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Dentro do RISC, os miRNAs se ligam a sequências complementares de mRNAs alvo para reprimir sua tradução ou induzir sua degradação.

Fonte: JUNG; SUH, 2014.

### Polimorfismos de selecionados dos genes *CYP11B2* e *AGT*

A escolha dos polimorfismos do gene da aldosterona sintase foi fundamentada no trabalho desenvolvido por Jia *et al.* (2014). Esse trabalho utilizou algumas ferramentas de modelagem molecular para prever o impacto da presença de um conjunto de polimorfismos genéticos na síntese e na conformação da proteína nativa. Dentre os polimorfismos genéticos que apresentaram associação deletéria sobre a síntese da aldosterona sintase, nós selecionamos o rs3097 C>T e rs3802228 A>G, presentes na região 3'UTR, devido ao impacto evidenciado pelas análises computacionais e por apresentarem características suficientemente polimórficas de acordo com o banco de dados utilizado. A inovação dessas

técnicas se baseia na possibilidade de aplicação dessas descobertas em estudos de associação genética. Não obstante, o nosso estudo busca compreender se essas alterações pontuadas por Jia *et al.* (2014) exercem alguma influência prática na clínica e se podem, ter alguma associação com a IC.

Além disso, selecionamos dois polimorfismos do gene *AGT* (rs699 A>G e rs3789678 C>T), uma vez que este gene é bastante explorado em estudos envolvendo o SRAA e que a importância do angiotensinogênio nesta via é indiscutível. Acredita-se, portanto, que qualquer alteração deletéria na síntese e na conformação da proteína nativa também poderia influenciar no desenvolvimento de doenças de origem cardiovascular.

### **Marcadores Informativos de Ancestralidade Humana de Inserção e Deleção (AIM-InDels)**

Apesar de as principais pesquisas em Genética Clínica envolverem o estudo da associação entre um gene suspeito e uma determinada doença através de estudos caso-controle, nem sempre as diferenças entre as amostras são causadas pelo fenótipo investigado e sim por estratificações populacionais (TIAN *et al.*, 2006). Associações espúrias podem ser resultantes da estrutura genética amostral que, na maioria dos casos, não são detectadas com base nas informações obtidas no objeto de estudo (TIAN *et al.*, 2006). Esse tipo de erro é mais passível de acontecer em estudos clínicos envolvendo populações como a brasileira, que é uma das mais heterogêneas do mundo, sendo resultado do processo de miscigenação entre povos Nativos Americanos, Europeus e Africanos (PENA *et al.*, 2011).

Estimativas das proporções ancestrais, com base no uso de marcadores moleculares de ancestralidade, vêm sendo investigadas para responder inúmeras questões. Dentre essas questões estão aquelas relacionadas à colonização, migração e padrão ancestral da população brasileira. Além disso, esses marcadores são fundamentais para o controle de um possível efeito na subestrutura populacional em estudos de associação (PEREIRA; PENA, 2006).

Os marcadores informativos de ancestralidade são polimorfismos do tipo InDels. Eles são caracterizados pela inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos e apresentam elevada divergência de frequências alélicas entre diferentes ancestrais ou populações geograficamente distintas. Em função disso, são especialmente utilizados para inferir a origem ancestral de um indivíduo ou a proporção entre grupos ancestrais existentes em uma

população altamente miscigenada, como a brasileira por exemplo (FRUDATKIS *et al.*, 2003; KAYSER, KNIJFF, 2011).

Em síntese, a análise de polimorfismos genéticos que estão atrelados ao SRAA possibilitará avaliar o risco associado à IC. Além disso, a análise do perfil ancestral das amostras possibilitará eliminar uma associação espúria inerente a diferenças ancestrais entre os grupos amostrais. O impacto desse estudo se dá pelo pioneirismo na utilização de critérios genéticos de ancestralidade a fim de criar grupos com características homogêneas quanto à etnia, enquanto outros estudos em genética clínica se baseiam em critérios de autodeclaração de cor de pele. A perspectiva dessa pesquisa é, portanto, identificar se existe risco relativo para IC associado aos polimorfismos em questão, contribuindo para a melhor abordagem de cada caso específico de IC.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo geral

Avaliar polimorfismos, com associação supostamente deletéria, presentes nos genes *CYP11B2* e *AGT*, em amostras de pacientes com IC isquêmica e não isquêmica e de indivíduos saudáveis agrupados com base no padrão de ancestralidade, a fim de determinar se existe risco cardiovascular associado a esses polimorfismos.

### 1.2 Objetivos específicos:

- a) estimar e comparar as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos rs3802228 A>G e rs3097 C>T (presentes no gene *CYP11B2*) e rs699 A>G e rs3789678 C>T (presentes no gene *AGT*), em amostras provenientes de indivíduos saudáveis e de pacientes com IC;
- b) determinar o perfil de ancestralidade das amostras pertencentes ao estudo através dos marcadores AIM-InDels;
- c) comparar as frequências dos marcadores SNPs selecionados entre os grupos caracterizados por ancestralidade;
- d) identificar possíveis associações com o desfecho de IC isquêmica e não isquêmica.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Amostras

Esse estudo foi desenvolvido por grupo de pesquisa que conta com uma equipe multidisciplinar em que se destacam pesquisadores do Serviço de Cardiologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto e do Laboratório de Diagnóstico por DNA da UERJ, que atuam em colaboração desde 2012. A partir dos estudos já desenvolvidos no âmbito dessa linha de pesquisa, dados e amostras de cerca de 600 indivíduos, incluindo pacientes com diferentes etiologias de DCs atendidos nos ambulatórios de Insuficiência Cardíaca do HUPE e indivíduos sem histórico de DCs e metabólicas, já foram coletados para fins de análise molecular.

Para esse trabalho foram selecionadas um total de 369 dessas amostras para elegibilidade, das quais 247 amostras de pacientes e 122 de controles foram utilizadas ao final do trabalho. Essas amostras foram coletadas a partir de projetos desenvolvidos no âmbito dessa linha de pesquisa, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, sob os números 2541-CEP/HUPE – CAAE: 0176.0.228.000-09, 2549-CEP/HUPE – CAAE: 0175.0.228.000-09 (ANEXOS A e B). Com base no perfil dos indivíduos, três grupos foram estabelecidos para o presente estudo: pacientes acometidos por IC de etiologia isquêmica (n=117), não-isquêmica (n=130) e indivíduos sem histórico de doenças metabólicas ou cardiovasculares (n=122), empregadas no presente estudo como amostras controles.

As amostras foram coletadas por doação voluntária livre e esclarecida de indivíduos residentes no Estado do Rio de Janeiro. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO D) foi elaborado e aprovado pela Comissão Científica e pelo Comitê de Ética, sendo aplicado aos participantes antes de qualquer procedimento. Todos foram orientados quanto à participação do estudo, à coleta laboratorial de sangue e ao uso de seu histórico médico.

Os pacientes inclusos no presente estudo foram submetidos a exames laboratoriais de rotina durante todo o tempo de acompanhamento no ambulatório de IC do HUPE. A coleta dos dados clínicos incluiu sempre o exame laboratorial de data mais recente. Todas as informações clínicas e laboratoriais pertinentes a este trabalho foram retiradas dos

prontuários de cada paciente. A presença de comorbidades como HAS e dislipidemias foi previamente julgada pelo médico responsável pelo acompanhamento dos pacientes e relatadas em seus respectivos prontuários. Alguns dados relativos a determinados pacientes encontraram-se ausentes nos prontuários virtuais, devido ao fato de certos pacientes serem retirados do sistema quando transcorrido um tempo após óbito comprovado ou descontinuidade do tratamento no HUPE. Portanto, o número de amostras variou de uma análise para outra, mas acredita-se que o impacto dessa variação não tenha sido prejudicado a validade dos resultados.

### 2.1.1 Amostras de pacientes com IC

Para esse estudo, o grupo de pacientes contou com 248 amostras no total. Essas amostras são provenientes de indivíduos acompanhados no ambulatório de IC do Serviço de Cardiologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) através de equipe multidisciplinar composta por médicos cardiologistas, enfermeiros, nutricionistas e biólogos.

Realizou-se uma análise retrospectiva do prontuário de cada paciente para a coleta dos dados clínicos de interesse, obtendo-se assim, as informações necessárias de todos os pacientes desde o início do acompanhamento. Dessa forma, a caracterização do paciente como acometido pela IC, bem como a etiologia do quadro, foi estabelecida a partir do julgamento clínico do médico responsável pelo paciente.

Os dados coletados, por sua vez, incluíram: gênero, etnia, idade, idade no momento do diagnóstico, tempo de convivência com a doença, presença de comorbidades, gravidade da IC e óbito. A realização das análises genéticas, por fim, foi possível a partir da coleta de amostra de sangue por bióloga especializada e posterior armazenamento e transporte dessas amostras para o Laboratório de Diagnósticos por DNA (LDD) da UERJ, onde as análises genéticas foram realizadas. Os critérios de inclusão adotados foram indivíduos maiores de 18 anos, não aparentados, com tempo de seguimento ambulatorial na Clínica IC-HUPE superior a um ano e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os critérios de exclusão, por sua vez, foram indivíduos menores que 18 anos, pacientes com etiologia da IC ainda não elucidada e sem registro médico completo.

### 2.1.2 Amostras de indivíduos controle

O total de amostras provenientes de indivíduos sem histórico de doenças cardiovasculares e utilizadas como controle, corresponde a 122 voluntários selecionados pelo Serviço de Cardiologia do HUPE/UERJ. Esses indivíduos não possuíam acompanhamento médico prévio, e em sua maioria eram mais jovens que os pacientes inclusos no estudo. As doenças cardiovasculares, por sua vez, foram descartadas mediante inferências realizadas a partir de questionário direto e ausência de pressão arterial elevada. Os dados utilizados foram gênero, idade e presença de comorbidades, apenas. A coleta do sangue desses indivíduos e a utilização do seu material genético para análises futuras foi aprovada pelo comitê de ética sob o número 12144313.8.0000.5259 (ANEXO C).

Tanto as amostras de pacientes quanto as amostras de indivíduos controle foram coletadas de sangue venoso (10 mL) distribuídos em dois tubos do Sistema Vacutainer® (Becton-Dickinson). Um dos tubos foi encaminhado para o Laboratório Central do HUPE para a realização das dosagens bioquímicas e o outro tubo foi encaminhado para o LDD, para a realização de extração de DNA e análises moleculares. Todas as amostras de DNA foram coletadas e extraídas entre os anos de 2012 a 2019 e fazem parte de um banco de DNA, sob a responsabilidade da doutora Dayse Aparecida da Silva.

## 2.2 **Extração do DNA**

Todas as amostras submetidas às análises moleculares tiveram o DNA extraído por *Salting-out* (MILLER *et al.*, 1988).

A técnica baseou-se na transferência de uma alíquota de 2 mL do sangue total para um tubo cônico. Em seguida, adicionou-se 2 mL de tampão de lise de hemácias (NH<sub>4</sub>Cl 155 mM, KHCO<sub>3</sub> 10 mM e EDTA 1 mM), homogeneizando-se a solução contida no tubo, para posteriormente centrifugá-la a 3.000 G por 5 minutos (todas as centrifugações nessa velocidade foram realizadas em centrífuga refrigerada “Novatecnica NT805”). Terminada a centrifugação descartou-se o sobrenadante. Observou-se a presença de um *pellet* que foi desprendido manualmente e a este foram acrescentados 500 µL de tampão de lise de células

e 30 µL de proteinase K 20 mg/mL. Homogeneizou-se o tubo manualmente e incubou-se a 37 °C por 12 horas. Após a digestão, adiciona-se 300 µL de NaCl 6M e agitou-se a solução por cerca de 30 segundos. O tubo, então, foi centrifugado por 10 minutos a 3000 G. O sobrenatante, por conseguinte, foi transferido para um novo tubo cônico e adicionou-se a este 1 mL de etanol gelado. O tubo foi homogeneizado e o etanol descartado. Uma vez observada a precipitação de DNA após o descarte do álcool, foram adicionados ao precipitado 300 µL de TE (10 mL de Tris pH 8,0; 1,0 mM EDTA pH 8,0) e a amostra foi mantida a -20 °C em freezer no LDD. Vale ressaltar que quando começamos a trabalhar com as amostras, aquelas provenientes tanto de pacientes, como de controles, já haviam sido extraídas, uma vez que foram aproveitadas de estudos anteriores.

### 2.3 Genotipagem dos polimorfismos SNPs

Como estratégia para a genotipagem dos SNPs, optamos por utilizar metodologia baseada em PCR *multiplex*. Essa técnica é constituída por reações que incluem pares de iniciadores, desenhados especificamente para a amplificação simultânea dos *loci* de interesse. Após essa primeira reação, alíquotas foram purificadas e submetidas a reações de extensão de base única (SNaPshot). O Quadro 2 contém informações acerca dos polimorfismos selecionados para o presente estudo.

Quadro 2 - Informações dos SNPs empregados no estudo

Gene	Símbolo	Cromossomo	dbSNP ID (build=153)	Alelos	Alelos no GM
Aldosterona sintase	<i>CYP11B2</i>	8	rs3802228	A > G	T > C
			rs3097	C > T	G > A
Angiotensinogênio	<i>AGT</i>	1	rs699	A > G	C > T
			rs3789678	C > T	C > T

Legenda: *Gene Mapper software* (GM).

Fonte: A autora, 2020.



### 2.3.1 Desenho dos primers de amplificação e extensão

As sequências Fasta dos SNPs de interesse foram retiradas do banco de dados dbSNP da plataforma *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e utilizadas para a confecção dos oligonucleotídeos iniciadores. Tanto os pares de iniciadores para a reação da PCR *Multiplex* quanto para a reação de extensão de base única (SNaPshot) foram desenhados utilizando o programa *Primer3* (KORESSAAR; REMM, 2007; UNTERGASSER *et al.*, 2012), selecionando-se para o desenho dos mesmos os seguintes parâmetros: número de nucleotídeos igual a 20 pares de base (pb), tamanho de produto entre 50-250 pb e temperatura de anelamento de 60°C. Os iniciadores da reação de extensão foram desenhados para se anelarem em posição adjacente ao sítio do SNP alvo. Após escolhidas as melhores combinações de *primers* sugeridas pelo *software*, foram analisadas as possíveis interações entre todos, uma vez que para a produção do *Multiplex* seria necessário haver o mínimo de interação entre os oligonucleotídeos. Para tal, utilizou-se o *software National Institute of Standards and Technology* (NIST, c2005).

Amplificações individuais de cada região foram realizadas a partir do DNA padrão K562 (2 ng/μL), a fim de analisar se os *primers* desenhados eram capazes de amplificar as regiões selecionadas para análise.

### 2.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

#### 2.3.2.1 Teste dos *Primers*

A PCR para teste dos *primers* foi realizada utilizando o kit QIAGEN PCR *Multiplex*® (QIAGEN), onde 1,5 μL de DNA K562 (2 ng/μL) foram adicionados a 5 μL do Tampão Master Mix QIAGEN 2x, 1,0 μL da mistura de *primers* a 2,5 μM cada e água estéril para completar o volume final de 10,0 μL. A reação de PCR foi desenvolvida no termociclador Veriti Thermal Cycler™ (Thermo Fisher Scientific™) sob as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguida de trinta e cinco ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 90 segundos e 72 °C por 60 segundos,

seguida de extensão final a 72 °C por 10 minutos. A eficiência da PCR foi avaliada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% em tampão TAE 1x dos produtos da PCR corados com SaferDye (KASVI), visualizados utilizando trans iluminador de LED (KASVI®), onde se observou os fragmentos de amplificação da PCR Mutiplex em pares de base, conforme os tamanhos esperados.

### 2.3.2.2 PCR Multiplex

A PCR *Multiplex* foi realizada utilizando o kit QIAGEN PCR *Multiplex*® (QIAGEN), onde 1,5 µL de DNA (0,5-5 ng/µL) foram adicionados a 2,5 µL do Tampão Master Mix QIAGEN 2x, 1,0 µL da mistura de *primers* a 2,5 µM cada e água estéril para completar o volume final de 5,0 µL. A reação de PCR foi desenvolvida no termociclador Veriti Thermal Cycler™ (Thermo Fisher Scientific™) sob as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos, seguida de trinta e cinco ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 90 segundos e 72 °C por 60 segundos, seguida de extensão final a 72 °C por 10 minutos. A eficiência da PCR foi avaliada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% em tampão TAE 1x e os produtos da PCR corados com SaferDye (KASVI) e visualizados utilizando trans iluminador de LED (KASVI®), onde se observou os fragmentos de amplificação da PCR Mutiplex em pares de base, conforme os tamanhos esperados.

Os produtos da PCR (1 µL) foram purificados com 0,7 µL da enzima exonuclease, 10 U/µL (ExoSAP-IT™ - Thermo Fisher Scientific™) que elimina o excesso de iniciadores e nucleotídeos do produto da PCR. Para a reação utilizou-se o termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific™) a 37°C por 30 minutos, seguido de 15 minutos a 85°C. O Quadro 3 contém as informações referentes aos pares de oligonucleotídeos desenhados para o presente estudo.

Quadro 3 - *Primers* nos sentidos *forward* (F) e *reverse* (R) para amplificação

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5' - 3')	Tamanho do <i>primer</i> (pb)	Tamanho do fragmento (pb)	TM °C
rs3097-PF	GCACTTCCTGGTGGAGACAC	20	174	61
rs3097-PR	CAGAGGGGTGACTCAGGAAG	20		60
rs3802228-PF	ACCTTGTTGCCCCCTTATTC	20	250	60
rs3802228-PR	TCCTGTGCAGGGACAGGAAG	20		60
rs699-PF	GAACTGGATGTTGCTGCTGA	20	116	60
rs-699-PR	AGAGCCAGCAGAGAGGTTTG	20		60
rs3789678-PF	ATACCAGAGCCCCTGAGACA	20	192	58
rs3789678-PR	GCCATCAGGAGGAATAGCAG	20		60

Legenda: *Primer forward* (PF); *primer reverse* (PR); pares de bases do *primer* (pb); temperatura de *melting* (TM).

Fonte: A autora, 2020.

### 2.3.3 Reação de extensão de nucleotídeo único por SNaPshot

A reação de extensão para a genotipagem dos polimorfismos foi realizada utilizando-se o kit SNaPshot™ *Multiplex System* (Thermo Fisher Scientific™), adicionando-se 1 µL do produto purificado, 1,0 µL de SNaPshot™ *Multiplex Ready Reaction Mix*, 1,5 µL do mix de iniciadores de extensão e água até completar o volume de 5 µL. A reação ocorreu no termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific™) e seguiu os seguintes parâmetros: vinte e cinco ciclos de 95 °C por 10 segundos, 51 °C por 5 segundos e 60 °C por 30 segundos. Os produtos foram purificados pela adição de 2,0 µL da enzima SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase – Thermo Fisher Scientific™), no mesmo termociclador, a 37 °C por 60 minutos e a 85 °C por 15 minutos.

Seguiu-se a eletroforese capilar em sequenciador automático ABI Prism 3500® (Thermo Fisher Scientific™), utilizando 1 µL do produto da reação de SNaPshot purificado, com 8,9 µL de formamida HiDi™ (Thermo Fisher Scientific™) e 0,1 µL de Liz 120™ Size standard (Thermo Fisher Scientific™).

O resultado obtido pela eletroforese capilar é representado por um eletroferograma onde são observados picos resultantes do processo de emissão, detecção e transformação do sinal luminoso, que são visualizados em unidades relativas de fluorescência (RFU). Após a eletroforese capilar, os fragmentos gerados foram analisados por meio do programa Gene Mapper™ 4.1 (Applied Biosystems™). O Quadro 4 ilustra as sequências dos *primers* empregados na reação de extensão de nucleotídeo único por SNaPshot.

Quadro 4 - Sequências dos *primers* de extensão

Polimorfismo	Sequência 5'-3'	Tamanho do primer (pb)	TM°C
rs3097	CCTGTCTTCTCTCCCAC	17	51
rs3802228	CATGAAAGGGGAAATAC	17	48
rs699	TGGCTGCTCCCTGA	14	53
rs3789678	AGCCCAATTCCTG	14	50

Legenda: pares de bases do *primer* (pb); temperatura de *melting* (TM).

Fonte: A autora, 2020.

#### 2.4 Reação de sequenciamento

Cerca de 10% das amostras (N= 30) foram também submetidas à análise dos polimorfismos estudados pela técnica de sequenciamento de Sanger, visando a comparar as genotipagens obtidas nas duas técnicas para a validação da metodologia desenvolvida. Para isso, alíquota dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação de 2 ng das amostras selecionadas com os marcadores em estudo, conforme protocolo descrito no item 4.3.2.2, foram submetidas a uma purificação enzimática com ExoSAP-ProStar™ (GE Healthcare Life Sciences) em que para cada 5,0 µL de produto de PCR foram adicionados 2,0 µL de enzima. Os tubos das reações foram incubados em termociclador a 37 °C durante 15 min, que se seguiram por mais 15 min sob uma temperatura de 85 °C. Após a purificação, realizamos a reação de sequenciamento em que para cada marcador foram preparados dois tubos de reação: um para o *primer forward* e outro para o *reverse*. Foi utilizado para cada tubo de reação um volume equivalente a 1,0 µL de enzima BigDye (Thermo Fisher Scientific™), 1,0 µL de tampão BigDye (Thermo Fisher Scientific™), 1,0 µL do *primer forward* ou 1,0 do *primer reverse* a 2,5 µM e 2,0 µL de produto de PCR purificado. Posteriormente, os produtos da reação foram purificados com a resina SEPHADEX G-50. Para cada tudo de amostra purificado foram adicionados 10 µL de formamida HiDi e a solução final submetida a eletroforese capilar no sequenciador automático ABI PRISM 3500 (Thermo Fisher Scientific™). A análise das sequências geradas e a genotipagem foram realizadas no programa SequencingAnalysis® 3.7 (Thermo Fisher Scientific™).

## 2.5 Estimativa de ancestralidade por AIMs-InDels

Com a finalidade de estimar o perfil de ancestralidade das amostras empregadas no presente estudo, foi utilizado o sistema *multiplex* AIMs descrito por Pereira *et al.* (2012), o qual é composto por 46 marcadores (Quadro 5) com frequências alélicas significativamente diferentes entre africanos, europeus, asiáticos e ameríndios, sendo portanto, altamente informativos para cada um dos quatro grupos populacionais.

Na PCR, foi utilizado o tampão QIAGEN *Multiplex* PCR (QIAGEN). A mistura de reagentes consistiu de 2 ng de DNA genômico, 1  $\mu$ L de *primer mix* a 2  $\mu$ M cada *primer* e 5  $\mu$ L de master mix 2x concentrado num volume final de 10  $\mu$ L. As condições de temperatura incluíram uma etapa inicial de 95 °C por 15 min; uma etapa intermediária com 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 60 °C por 90 seg e 72 °C por 45 seg. E por fim, uma etapa de extensão final de 72 °C por uma hora. A reação foi realizada no termocilador Veriti (Thermo Fisher Scientific™).

Quadro 5 - *Primers* utilizados para a amplificação dos AIM-InDels

MID*	rs number	Chromosome	Position (bp)**	Alleles described in dbSNP
MID-1470	rs2307666	11	64729920	-/GTTAC
MID-777	rs1610863	16	6551830	-/GAA
MID-196	rs16635	6	99789775	-/CAT
MID-881	rs1610965	5	79746093	-/ACTT
MID-3122	rs35451359	18	45110983	-/ATCT
MID-548	rs140837	6	3708909	-/CT
MID-659	rs1160893	2	224794577	-/CT
MID-2011	rs2308203	2	109401291	-/CTAGA
MID-2929	rs33974167	8	87813725	-/TA
MID-593	rs1160852	6	137345857	-/TT
MID-798	rs1610884	5	56122323	-/GGGAAA
MID-1193	rs2067280	5	89818959	-/AT
MID-1871	rs2308067	7	127291541	-/TT
MID-17	rs4183	3	3192524	-/TAAC
MID-2538	rs3054057	15	86010538	-/AACA
MID-1644	rs2307840	1	36099090	-/GT
MID-3854	rs60612424	6	84017514	-/TCTA
MID-2275	rs3033053	14	42554496	-/TCAGCAG
MID-94	rs16384	22	42045009	-/AAC
MID-3072	rs34611875	18	67623917	-/GCCCCCA
MID-772	rs1610859	5	128317275	-/TAG
MID-2313	rs3045215	1	234740917	-/ATTATAACT
MID-397	rs25621	6	139858158	-/TTCT
MID-1636	rs2307832	1	55590789	-/AA
MID-51	rs16343	4	17635560	-/TTTAT
MID-2431	rs3031979	8	73501951	-/ATTG
MID-2264	rs34122827	13	63778778	-/AAGT
MID-2256	rs133052	22	41042364	-/CAT
MID-128	rs6490	12	108127168	-/ATT
MID-15	rs4181	2	42577803	-/AAATACACAC
MID-2241	rs3030826	6	67176774	-/GTCCAATA
MID-419	rs140708	6	170720016	-/AATGGCA
MID-943	rs1611026	5	82545545	-/TGAT
MID-159	rs16438	20	25278470	-/CCCCA
MID-2005	rs2308161	10	69800909	-/AACAAT
MID-250	rs16687	7	83887882	-/CA
MID-1802	rs2307998	5	7814345	-/GGA
MID-1607	rs2307803	3	108981031	-/TG
MID-1734	rs2307930	6	84476378	-/CCAT
MID-406	rs25630	6	14734341	-/AG
MID-1386	rs2307582	1	247768775	-/AAACTATTCATTTTCACCT
MID-1726	rs2307922	1	39896964	-/CAAGAACTATAAT/CACTATCTATTAT
MID-3626	rs11267926	15	45526069	-/AATATAATTTCTCCA
MID-360	rs25584	12	112145217	-/AA
MID-1603	rs2307799	5	70828427	-/TTGT
MID-2719	rs34541393	20	30701405	-/AACT

Legenda: MID: Nomenclatura do marcador de acordo com o banco de dados Marshfield Diallelic Insertion/Deletion Polymorphisms (MID).

Nota: Os *primers* marcados com fluorescência foram divididos em quatro canais (6FAM, VIC, NED e PET). As letras minúsculas dos *primers* não marcados representam sequências de caudas adicionadas aos *primers*.

Fonte: Adaptado de Pereira *et al.*, 2012.

## 2.6 Análises estatísticas

Os cálculos das frequências alélicas e genótípicas observadas para os marcadores selecionados foram executados no *software* Epi Info v.7 (*Centers for Disease Control and Prevention*).

As frequências alélicas de cada SNP foram testadas em relação à conformidade com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, com base no teste exato de diferenciação populacional de Raymond e Rousset (1995), no *software* Arlequin v3.5 (EXCOFFIER *et al.*, 2005) e com base no qui-quadrado de Pearson, no *software* SNPStats (SOLÉ *et al.*, 2006).

Os testes de associação para verificar a homogeneidade das amostras e diferenças em distribuição de proporções, tais como o qui-quadrado de Pearson e o teste exato de Fisher foram processados por meio do *software* Epi Info v. 7 (*Centers for Disease Control and Prevention*). Esses testes foram realizados para todos os modelos de herdabilidade conhecidos: codominância, dominância, recessividade, sobredominância e alélico. O teste paramétrico ANOVA foi utilizado para a realização de análises com variáveis numéricas. O teste do qui-quadrado foi utilizado para comparar as frequências das variáveis categóricas relativas às características demográficas das populações estudadas, bem como a associação da presença de polimorfismos no gene *CYP11B2* e *AGT* com a IC.

As estimativas de proporções de ancestralidade individual e global das amostras foram obtidas usando o *software* STRUCTURE v2.3.4 (PRITCHARD *et al.*, 2000). Essa análise foi feita com base nos perfis genéticos obtidos para os AIMS, tendo-se como referências populações africanas, europeias e ameríndias do painel de diversidade HGDP-CEPH (H952) (PEREIRA *et al.*, 2012). Foi utilizado um percentual mínimo de 70% de contribuição de uma população específica para classificar os indivíduos em europeus, africanos ou ameríndios. Aqueles indivíduos com proporções de ancestralidade inferiores a 70% foram classificados como miscigenados. Por fim, categorizou-se esses grupos bem delimitados de indivíduos para a realização dos testes estatísticos e de associação.

O teste exato de Raymond e Rousset (1995) com base nas distâncias  $F_{st}$  também foi aplicado para a avaliação dos níveis de diferenciação entre os grupos. A distância  $F_{st}$ , por sua vez, representa o grau de diferenciação entre duas populações. Esse teste foi utilizado para comparações par-a-par em relação ao conjunto total de polimorfismos selecionados e em relação a cada polimorfismo separadamente.

Com a finalidade de associar um alelo ou genótipo dos polimorfismos selecionados com o prognóstico de IC ou o desenvolvimento da doença para uma forma mais grave, foi realizado o teste do qui-quadrado de Pearson para a obtenção do valor de  $p$  ( $<0,05$ ) e o teste de *odds ratio* nos *softwares* Epi Info v.7, que gerou valores de chances de acontecimento da doença nos determinados genótipos e seus intervalos de confiança de 95% (95% IC).

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Considerou-se 5,0% ( $p=0,05$ ) para o nível de rejeição da hipótese nula e *odds ratio* (OR), ajustado com o intervalo de confiança 95% (IC 95%).



### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Análise demográfica dos grupos estudados

Para essa avaliação foram considerados 247 pacientes. Destes, 117 eram pacientes com IC de etiologia isquêmica (IC-I) e 130 pacientes com IC de etiologia não isquêmica (IC-NI). Além destas foram também consideradas para essa análise 122 amostras de indivíduos sem histórico da doença, ao qual denominamos grupo controle (C).

As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos diferentes grupos estão descritas na Tabela 1. Os grupos de pacientes com IC-I e IC-NI apresentaram uma maior quantidade de indivíduos do sexo masculino que o grupo controle (IC-I=75,2% e IC-NI=58% *versus* C=41,8 ;  $p<0,05$ ) e idade mais avançada (IC-I =  $63,3 \pm 12,5$  e IC-NI =  $66,2 \pm 14,8$  *versus* C =  $39,9 \pm 11,6$ ;  $p<0,05$ ). Em relação a idade ao diagnóstico dos pacientes, os grupos IC-I e IC-NI apresentaram diferenças significativas (IC-I= $54,4 \pm 10,5$  *versus* IC-NI= $49,5 \pm 13,9$ ;  $p<0,05$ ). Em relação ao tempo (em anos) com a doença, evidenciou-se diferença estatisticamente significativa entre pacientes com IC-I e IC-NI (IC-I= $12,9 \pm 2,8$  e IC-NI= $18,7 \pm 5,8$ ,  $p<0,01$ ).

Os dados clínicos e laboratoriais como a fração de ejeção (FE), presença de hipertensão arterial sistêmica (HAS), presença de dislipidemia, índice de óbito, assim como a gravidade da doença, também foram analisados. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à FE (IC-I= $37,3 \pm 28,3$  *versus* IC-NI= $36,7 \pm 14,7$ ,  $p>0,05$ ), à presença de HAS (IC-I=73,3% *versus* IC-NI=70,7%,  $p>0,05$ ), óbito (IC-I= 46,6% *versus* IC-NI= 49,2%) e gravidade da doença (IC-I grave=31,9% *versus* IC-NI grave=41,4%,  $p>0,05$ ). Para as análises iniciais categorizou-se como forma grave da doença aquela com FE<30%, moderada 30%<FE<40% e leve FE>40%. Em relação à presença de dislipidemia, contudo, houve diferenças significativas entre pacientes de IC-I e IC-NI (IC-I=65,0% *versus* IC-NI=36,8%,  $p=2 \times 10^{-3}$ ) e entre IC-NI e controles (IC-NI=36,8% *versus* C=54,2%,  $p<0,01$ ).

Em relação ao perfil de ancestralidade genômica, observou-se que a componente da ancestralidade europeia foi predominante (EUR >70%) em todos os grupos estudados, sendo maior entre os pacientes com IC-I e controles em comparação com os pacientes com IC-NI (IC-I=62,9%, C=57,8% *versus* IC-NI=44,4%,  $p<0,01$ ). Por outro lado, o componente da ancestralidade africana (AFR >70%) foi o menos representativo nos três (IC-I=9,7% e IC-

NI=15,2% *versus* C=5,8%;  $p<0,01$ ). Não se evidenciou indivíduos com ancestralidade majoritariamente nativo americana (NAM > 70%). O grupo de indivíduos em que não foi observada predominância de qualquer dos três grupos de referência ancestral (europeus, africanos ou nativo americanos < 70%), denominado miscigenados, representou 27,4%, 40,7% e 36,4% dos indivíduos estudados em pacientes IC-I, IC-NI e controles.

Dentre os pacientes com IC, que tiveram declaradas informações de cor de pele em seus respectivos prontuários, o maior percentual foi de indivíduos de cor de pele branca (IC-I = 66,7%, IC-NI = 46,9%), seguido de pardos (IC-I = 17,1%, IC-NI = 26,9%) e negros (IC-I = 16,2%, IC-NI = 26,2%) como descrito na Tabela 1. Em relação às relações grupo a grupo de ancestralidade, observou-se diferença significativa entre pacientes com IC-I e controles ( $p=0,01$ ), e entre pacientes com IC-I e IC-NI ( $p<0,01$ ).

Tabela 1 - Dados demográficos, clínicos e de ancestralidade dos indivíduos saudáveis e pacientes incluídos no estudo

	IC	IC-I	IC-NI	C	(ICxC)	(IxC)	(NIxC)	(IxNI)
	<i>p</i>							
<b><i>N</i></b>	247	117	130	122				
Idade (anos)	64,8 ± 13,8	63,3 ± 12,5	66,2 ± 14,8	39,9 ± 11,6	<0,01	<0,01	<0,01	>0,05
Sexo: M/F (%)	66,1 / 33,9	75,2 / 24,8	58,0 / 42,0	41,8 / 58,2	<0,01	2x10 <sup>-7</sup>	0,01	<0,01
Idade/diagnóstico	50,9 ± 13,2	54,6 ± 10,6	49,5 ± 13,9	-	-	-	-	<0,05
Tempo de IC (anos)		12,9 ± 2,8	18,7 ± 5,8					<0,01
<b><i>Fração de Ejeção</i></b>		37,3 ± 28,3	36,7 ± 14,7	-	-	-	-	>0,05
<b><i>HAS (%)</i></b>								
<b><i>N</i></b>	136	30	106	-				
Sim	97 (71,3%)	22 (73,3%)	75 (70,7%)	-	-	-	-	>0,05
<b><i>Dislipidemia (%)</i></b>								
<b><i>N</i></b>	146	40	106	120				
Sim	65 (44,5)	26 (65,0%)	39 (36,8%)	65 (54,2%)	>0,05	>0,05	0,01	2x10 <sup>-3</sup>
<b><i>Óbito (%)</i></b>								
<b><i>N</i></b>	197	73	124					
Sim	95 (48,2%)	34 (46,6%)	61 (49,2%)	-	-	-	-	>0,05
<b><i>Gravidade (%)</i></b>								
<b><i>N</i></b>	244	116	128	-				
Grave	90 (36,9%)	37 (31,9%)	53 (41,4%)	-				
Moderada	74 (30,3%)	42 (36,2%)	32 (25,0%)	-	-	-	-	>0,05
Não grave	80 (32,8%)	37 (31,9%)	43 (33,6%)	-				
<b><i>Cor de pele (%)</i></b>								
<b><i>N</i></b>	247	117	130	-				
Branca	139(56,3%)	78 (66,7%)	61 (46,9%)	-				
Negra	53(21,4%)	19 (16,2%)	34 (26,2%)	-	-	-	-	<0,05
Parda	55(22,3 %)	20 (17,1%)	35 (26,9%)	-				
<b><i>Ancestralidade genômica (%)</i></b>								
<b><i>N</i></b>	231	113	118	121				
EUR	123(53,2%)	71 (62,9%)	52 (44,1%)	70 (57,8%)				
AFR	29(12,6%)	11 (9,7%)	18 (15,2%)	7 (5,8%)	>0,05	>0,05	0,01	<0,01
MIS	799 (34,2%)	31 (27,4%)	48 (40,7%)	44 (36,4%)				

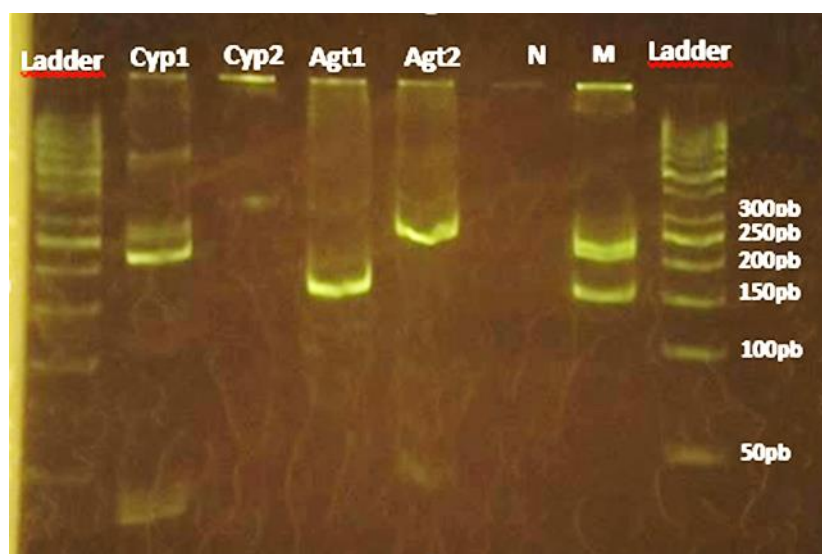
Legenda: Pacientes com IC isquêmica (IC-I), pacientes com IC não isquêmica (IC-NI), pacientes totais (IC), indivíduos controles (C), desvio padrão (dp); indivíduos de ancestralidade europeia (EUR); indivíduos de ancestralidade africana (AFR); indivíduos de ancestralidade miscigenada (MIS); Hipertensão arterial sistêmica (HAS).

Fonte: A autora, 2020.

### 3.2 Análises moleculares

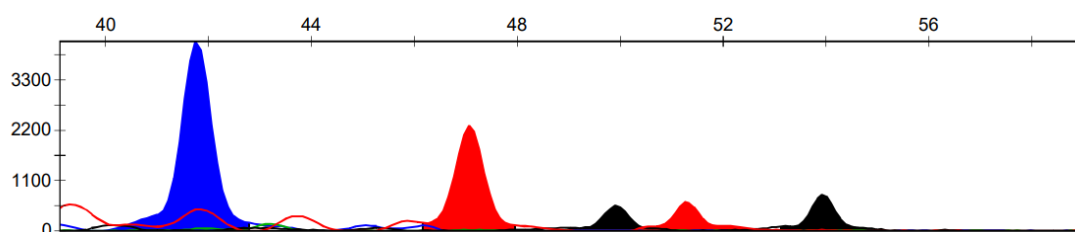
Inicialmente, para fins de padronização foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida (10%). Para tal, utilizaram-se produtos de PCR dos quatro marcadores de interesse, além do *multiplex* previamente preparado, de um controle negativo com H<sub>2</sub>O *nuclease free* e de uma *ladder* (GeneRuler 50pb DNA ladder – Thermo Fisher Scientific™), que funciona como um padrão de tamanho e peso molecular. Como é possível observar na Figura 5, os *primers* desenhados foram capazes de proporcionar a amplificação dos quatro polimorfismos de interesse, que apareceram no gel na faixa de tamanho esperada para os fragmentos gerados. A Figura 6 demonstra o perfil do *multiplex* com os quatro marcadores finais selecionados e as Figuras (7-10) exemplos de resultados do sequenciamento desses marcadores.

Figura 5 - Gel de poliacrilamida 10% indicando os produtos de amplificação dos marcadores estudados



Nota: cyp1: rs3097; cyp2: rs3802228; AGT1: rs699; AGT2: rs3789678; N: controle negativo; M: *multiplex*; *Ladder*; padrão de peso molecular.  
Fonte: A autora, 2020.

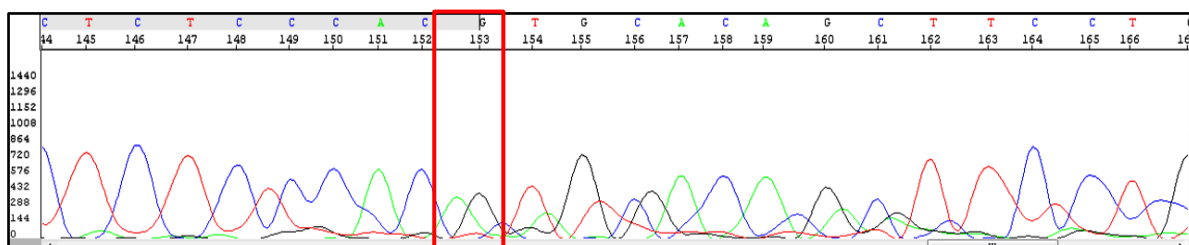
Figura 6 - Eletroferograma com *multiplex* concernente a amostra pertencente ao grupo controle



Legenda: O primeiro pico em azul (homozigoto GG) corresponde ao polimorfismo rs3097; o segundo pico em vermelho (homozigoto TT) corresponde ao rs699; o terceiro (heterozigoto CT) ao rs3802228; e o quarto (homozigoto CC) ao rs3789678.

Fonte: A autora, 2020.

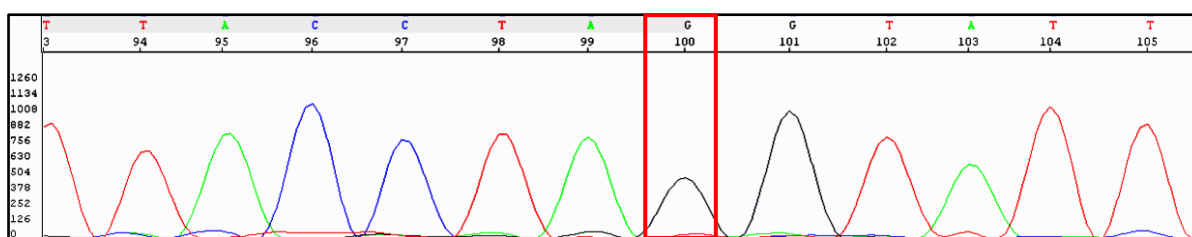
Figura 7 - Eletroferograma demonstrando o rs3097 C>T



Legenda: Genótipo GA (= CT) do polimorfismo rs3097.

Fonte: A autora, 2020.

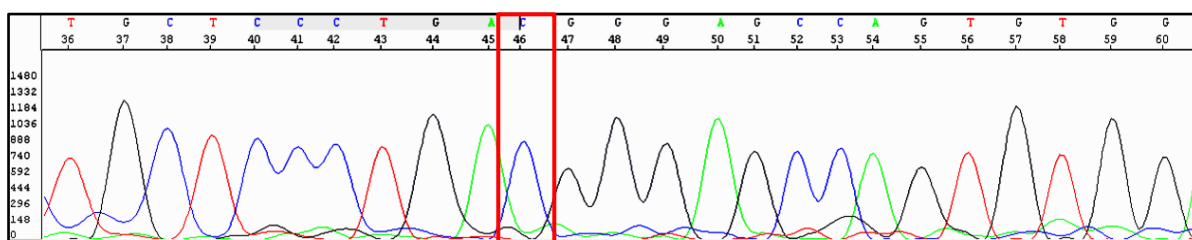
Figura 8 - Eletroferograma demonstrando o rs3802228 A>G



Legenda: Genótipo GG do polimorfismo rs3802228.

Fonte: A autora, 2020.

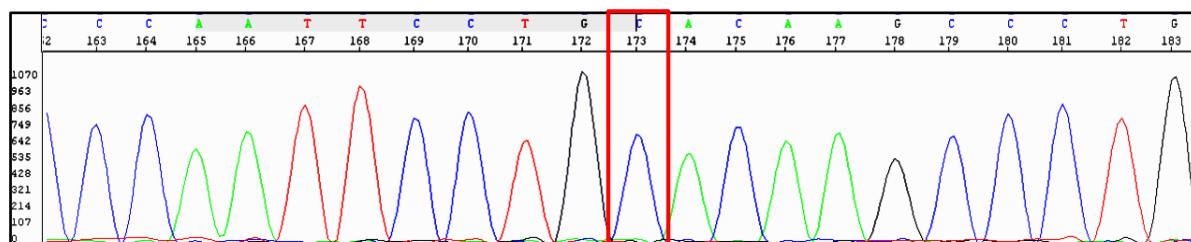
Figura 9 - Eletroferograma demonstrando o rs699 A>G



Legenda: Genótipo CC (= GG) do rs699.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 10 - Eletroferograma demonstrando o rs3789678 C&gt;T



Legenda: Genótipo CC do rs3802228.

Fonte: A autora, 2020.

### 3.2.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Os *softwares* Arlequin 3.5.2.2 e SNPStats foram selecionados para o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) relativo aos polimorfismos incluídos no estudo. O Arlequin utiliza o teste exato para a obtenção do valor de HW e o SNPStats o qui-quadrado de Pearson. A Tabela 2 contém a análise comparativa das distribuições das frequências alélicas e genotípicas esperadas e observadas para cada polimorfismo e os valores de p estatístico calculados.

O polimorfismo rs3802228, especificamente, se encontra em desequilíbrio, considerando o resultado fornecido pelo Arlequin ( $p=0,03$ ), no grupo controle. Observou-se que o suposto desequilíbrio previsto pelo teste exato de Raymond e Rousset (1995) não persistiu quando aplicado o teste qui-quadrado de Pearson pelo *software* SNPStats ( $p=0,84$ ), prosseguindo-se com as análises subsequentes.

Tabela 2 - Distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos selecionados nos genes *CYP11B2* e *AGT* em pacientes isquêmicos, não isquêmicos e controles

	I (N=117)	NI (N=130)	C (N=122)
<b>rs3097 (<i>CYP11B2</i>)</b>	<b>No (%)</b>	<b>No (%)</b>	<b>No (%)</b>
CC	48 (41,0)	50 (38,5)	77 (63,1)
CT	59 (50,5)	68 (52,3)	38 (31,2)
TT	10 (8,5)	12 (9,2)	7 (5,7)
C	107 (91,5)	118 (90,8)	115 (94,3)
T	10 (8,5)	12 (9,2)	7 (5,7)
<i>He</i>	0,45	0,46	0,34
<i>Ho</i>	0,51	0,52	0,3
<i>p1</i>	0,15	0,12	0,27
<i>p2</i>	0,22	0,13	0,42
<b>rs3802228 (<i>CYP11B2</i>)</b>			
AA	20 (17,1%)	24 (18,6%)	19 (18,6%)
AG	49 (41,9%)	56 (43,4%)	52 (51,0%)
GG	48 (41,0%)	49 (38,0%)	31 (30,4%)
G	97 (82,9%)	105 (81,4%)	83 (81,4%)
A	20 (17,1%)	24 (18,6%)	19 (18,6%)
<i>He</i>	0,45	0,47	0,49
<i>Ho</i>	0,47	0,5	0,6
<i>p1</i>	0,68	0,57	0,03
<i>p2</i>	0,43	0,47	0,84
<b>rs699 (<i>AGT</i>)</b>			
AA	25 (21,4%)	24 (18,3%)	26 (21,5%)
GA	59 (50,4%)	64 (48,9%)	57 (47,1%)
GG	33 (28,2%)	43 (32,8%)	38 (31,4%)
G	92 (78,6%)	106 (80,9%)	94 (77,7%)
A	25 (21,4%)	25 (10,1%)	27 (22,3%)
<i>He</i>	0,5	0,49	0,50
<i>Ho</i>	0,5	0,49	0,49
<i>p1</i>	1	1	0,85
<i>p2</i>	1	0,86	0,47
<b>rs3789678 (<i>AGT</i>)</b>			
CC	81 (69,8%)	71 (63,4%)	88 (72,7%)
CT	31 (26,7%)	34 (30,4%)	30 (24,8%)
TT	4 (3,6%)	7 (6,2%)	3 (2,5%)
C	112 (96,5%)	105 (93,7%)	118 (97,5%)
T	4 (3,5%)	7 (6,3%)	3 (2,5%)
<i>He</i>	0,28	0,32	0,22
<i>Ho</i>	0,26	0,28	0,22
<i>p1</i>	0,73	0,17	1
<i>p2</i>	0,74	0,27	0,72

Nota: o valor “p” estatístico indica a probabilidade de ocorrência ao acaso das distribuições genotípicas observadas (equilíbrio de HW) e foi calculado pelo teste exato de diferenciação populacional de Raymond e Rousset (1995) no *software* Arlequin (*p1*) e pelo qui-quadrado de Pearson no *software* SNPStats (*p2*). Heterozigidade esperada (*He*); Heterozigidade observada (*Ho*);

Fonte: A autora, 2020.

### 3.2.2 Comparação das frequências dos polimorfismos entre grupos

Os valores de probabilidade de não diferenciação, calculados com base na distância genética  $F_{st}$  das frequências genotípicas dos quatro marcadores genéticos analisados, foram obtidos para comparações de grupos de interesse a fim de determinar se um grupo possui distância significativa com outro grupo, conforme demonstrado na Tabela 3.

Observou-se diferenças significativas entre o grupo controle *versus* IC-I ( $p=0,003$ ) e controle *versus* IC-NI ( $p=0,001$ ), enquanto não evidenciou-se diferença significativa entre o grupo IC-I *versus* IC-NI ( $p= 0,53$ ) (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética  $F_{st}$  das frequências genotípicas dos polimorfismos selecionados nas populações de casos e controle

	Controle	IC-I	IC-NI
Controle	*	+	+
IC-I	0,003	*	-
IC-NI	0,001	0,53	*

Legenda: + (diferença significativa); e – (diferença não significativa).

Nota: Os valores de  $p$  inferiores a 0,05 indicam significância de acordo com o teste de não diferenciação com base na distância genética  $F_{st}$ .

Fonte: A autora, 2020.

O teste qui-quadrado de Pearson foi realizado com o intuito de avaliar os possíveis níveis de diferenciação entre as amostras de indivíduos saudáveis e de indivíduos com IC, com base nas distribuições das frequências genotípicas de cada polimorfismo individualmente. Em relação às frequências genotípicas do polimorfismo rs3097 C>T, os resultados do teste de associação demonstraram diferença significativa entre o grupo controle *versus* o grupo de indivíduos com IC-I ( $p=9 \times 10^{-4}$ ), entre o grupo controle *versus* indivíduos com IC-NI ( $p=0,046$ ) e entre o total de pacientes (IC) *versus* grupo controle ( $p=2 \times 10^{-4}$ ). Para os demais polimorfismos, não se evidenciou resultados estatisticamente significativos (Tabela 4).



Tabela 4 - Comparação da distribuição genotípica dos polimorfismos selecionados entre os grupos estudados

	rs3097		rs3802228		rs699		rs3789678	
	$\chi^2(df=2)$	<i>p</i>	$\chi^2(df=2)$	<i>p</i>	$\chi^2(df=2)$	<i>p</i>	$\chi^2(df=2)$	<i>p</i>
IC-I x IC-NI	6,12	0,05	1,00	0,6	0,81	0,66	2,4	0,30
IC-I x C	13,9	<b>0,0009</b>	2,80	0,24	0,56	0,75	1,36	0,50
IC-NI x C	6,12	<b>0,046</b>	2,07	0,35	0,57	0,75	3,50	0,17
IC x C	18,0	<b>0,0002</b>	2,72	0,25	0,20	0,88	1,90	0,38

Nota: o valor *p* de significância foi estimado pelo teste qui quadrado de Pearson. As análises foram processadas pelo *software* Epi Info v.7.

Fonte: A autora, 2020.

O teste exato de Raymond e Rousset (1995) com base na distância *Fst* também foi calculado para a avaliação dos níveis de diferenciação entre os grupos. Em relação às frequências genotípicas observadas para o polimorfismo rs3097 C>T, os resultados foram significativos para a comparação entre alguns grupos, dentre os quais: controle *versus* IC-I ( $p=3,0 \times 10^{-3}$ ), controle *versus* IC-NI ( $p=1,0 \times 10^{-3}$ ), controle *versus* pacientes com IC totais ( $p=2,0 \times 10^{-4}$ ). Além disso, também foram observadas relações significativas entre as frequências genotípicas do polimorfismo rs3802228 A>G e alguns grupos, a saber: controles *versus* pacientes com IC-I ( $p=0,01$ ) e controles *versus* pacientes com IC totais ( $p=0,02$ ) (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação da distribuição genotípica dos polimorfismos selecionados entre os grupos estudados

	rs3097		rs3802228		rs699		rs3789678	
	<i>Fst</i> (df=2)	<i>p</i>	<i>Fst</i> (df=2)	<i>p</i>	<i>Fst</i> (df=2)	<i>p</i>	<i>Fst</i> (df=2)	<i>p</i>
IC-I x IC-NI	0,003±0,001	0,98	-0,003±0,002	0,60	-0,001±0,005	0,69	0,0004±0,0019	0,54
IC-I x C	0,03±0,0003	<b>0,003</b>	0,02±0,0004	<b>0,01</b>	-0,003±0,0040	0,86	0,002±0,0019	0,46
IC-NI x C	0,016±0,0001	<b>0,001</b>	0,006±0,001	0,12	-0,001±0,009	0,37	0,017±0,0009	0,07
IC x C	0,034±0,0001	<b>2x10<sup>-4</sup></b>	0,014±0,0006	<b>0,02</b>	0,009±0,011	0,52	0,009±0,0011	0,16

Nota: o valor *p* de significância foi estimado pelo teste exato de Raymond e Rousset (1995). A variável *Fst* representa a distância genética entre duas populações em relação a uma variável genética ou a um conjunto de variáveis genéticas. As análises foram processadas pelo *software* Arlequin 3.5.2.2.

Fonte: A autora, 2020.

Uma vez que foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de IC-I e IC-NI ( $p<0,01$ , Tabela 1), em relação à ancestralidade, realizou-se o teste

exato com base nas distâncias Fst para estimar as probabilidades de não diferenciação entre os pacientes totais do estudo, estratificados por ancestralidade.

A Tabela 6 demonstra que não existem diferenças estatisticamente significativas entre pacientes de ancestralidade europeia, africana e miscigenada, quando comparados entre si ( $p > 0,05$ ), em relação às distribuições genótípicas dos quatro marcadores avaliados.

Tabela 6 - Valores de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética Fst das frequências genótípicas dos quatro polimorfismos selecionados nas populações de casos estratificados por ancestralidade

	IC - EUR	IC - AFR	IC - MIS
IC - EUR	*	-	-
IC - AFR	0,08	*	-
IC - MIS	0,4	0,2	*

Legenda: + (diferença significativa); e – (diferença não significativa).

Nota: Os valores de p inferiores a 0,05 indicam significância de acordo com o teste de não diferenciação com base na distância genética Fst.

Fonte: A autora, 2020.

Similarmente, como verificou-se uma porcentagem significativamente superior de indivíduos do sexo masculino no grupo de casos, que do sexo feminino, realizou-se a mesma análise, estratificando o grupo de casos totais, em relação ao sexo.

A Tabela 7 evidencia que não existe diferença significativa entre pacientes com IC do sexo masculino e do sexo feminino ( $p > 0,05$ ), sugerindo que o perfil genotípico dos quatro polimorfismos não apresenta ligação com o sexo.

Tabela 7 - Valores de probabilidade de não-diferenciação com base na distância genética Fst das frequências genótípicas dos polimorfismos selecionados em pacientes estratificados por sexo

	Pacientes homens	Pacientes mulheres
Pacientes homens	*	-
Pacientes mulheres	0,8	*

Legenda: + (diferença significativa); e – (diferença não significativa).

Nota: Os valores de p inferiores a 0,05 indicam significância de acordo com o teste de não diferenciação com base na distância genética Fst.

Fonte: A autora, 2020.

### 3.3 Testes de associação dos polimorfismos estudados

As Tabelas 8-11 ilustram os principais resultados referentes aos testes de associação realizados. Os testes de associação com a IC foram realizados para os modelos de codominância, dominância, recessividade, sobredominância e alélico, respectivamente. Pode-se observar uma relação estatisticamente significativa entre as frequências genotípicas observadas do polimorfismo rs3097 nos grupos de casos totais *versus* controles ( $p=2,0 \times 10^{-4}$ ) (Tabela 8) e de indivíduos com IC-I *versus* controles ( $p=9,0 \times 10^{-4}$ ) para o modelo de codominância. Em relação ao modelo de dominância, igualmente observou-se associação estatisticamente significativa entre casos totais *versus* controles ( $p=3,0 \times 10^{-4}$ ), pacientes com IC-I *versus* controles ( $p=6 \times 10^{-4}$ ) e pacientes com IC-NI *versus* controles ( $p=9 \times 10^{-5}$ ) (Tabela 8). Essas associações persistiram nos modelos de sobredominância e alélico. Contudo, não foram vistas relações significativas para os demais polimorfismos, em quaisquer dos modelos de herdabilidade adotados ( $p>0,05$ ) (Tabelas 9-11).

Tabela 8 - Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs3097 C&gt;T e resultados dos testes de associação entre os grupos

rs3097 C>T		C	IC	IC-I	IC-NI	IC vs C	IC-I vs C	IC-NI vs C	IC-I vs IC-NI
Modelo genético	Genótipo	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
						OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
Codominante	CC	77 (63,1%)	98 (39,7%)	48 (41,0%)	50 (38,5%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	CT	38 (31,1%)	127 (51,4%)	59 (50,4%)	68 (52,3%)	<b>2,0 x 10<sup>-4</sup></b> <b>2,6 (1,6-4,2)</b>	<b>9,0 x 10<sup>-4</sup></b> <b>2,8 (1,6-5,1)</b>	0,046 2,7 (1,6-4,7)	0,92 1,1 (0,6-1,9)
	TT	7 (5,8%)	22 (8,9%)	10 (8,6%)	12 (9,2%)	<b>2,0 x 10<sup>-4</sup></b> 2,5 (1,0-6,0)	<b>9,0 x 10<sup>-4</sup></b> <b>2,3 (0,8-6,9)</b>	0,046 2,6 (1,0-7,2)	0,92 1,1 (0,4-2,9)
Dominante	CC	77 (63,1%)	98 (39,7%)	48 (41,0%)	50 (38,5%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	CT + TT	35 (36,9%)	149 (60,3%)	69 (59,0%)	80 (61,5%)	<b>3,0 x 10<sup>-4</sup></b> <b>2,6 (1,6-4,0)</b>	<b>6,0 x 10<sup>-4</sup></b> <b>2,4 (1,4-4,1)</b>	<b>9,0 x 10<sup>-5</sup></b> <b>2,7 (1,6 - 4,5)</b>	0,68 1,1 (0,7-1,8)
Recessivo	TT	7 (5,8%)	22 (8,9%)	10 (8,6%)	12 (9,2%)	0,39 1,4 (0,5-4,2)	0,5 1,5 (0,6-4,2)	0,3 1,7 (0,6-4,4)	0,85 1,1 (0,4-2,6)
	CT + CC	115 (94,2%)	225 (91,1%)	107 (91,4%)	118 (90,8%)	1,00	1,00	1,00	1,00
Sobredominante	CC + TT	84 (68,8%)	120 (48,6%)	58 (49,6%)	62 (47,7%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	CT	38 (31,1%)	127 (51,4%)	59 (50,4%)	68 (52,3%)	<b>2,0 x 10<sup>-4</sup></b> <b>2,3 (1,5-3,7)</b>	<b>1,0 x 10<sup>-3</sup></b> <b>2,56 (1,4-4,5)</b>	<b>6,0 x 10<sup>-4</sup></b> <b>2,4 (1,4-4,0)</b>	0,77 1,1 (0,6-1,8)
Alélico	C	192 (79,0%)	323 (65,0%)	155 (66,0%)	168 (65,0%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	T	52 (21,0%)	171 (35,0%)	79 (34,0%)	92 (35,0%)	<b>2 x 10<sup>-4</sup></b> <b>1,9 (1,4-2,8)</b>	<b>2 x 10<sup>-3</sup></b> <b>1,9 (1,2-2,8)</b>	<b>5 x 10<sup>-4</sup></b> <b>2,0 (1,3-3,0)</b>	0,7 1,1 (0,7-1,5)

Legenda: Indivíduos com IC isquêmica (IC-I); indivíduos com IC não isquêmica (IC-NI); indivíduos controles (C); casos totais (IC).

Nota: O valor p de significância foi calculado teste qui-quadrado de Pearson para o modelo de codominância e pelo teste exato de Fisher para os demais modelos.

Fonte: A autora, 2020.

Tabela 9 - Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs3802228 A&gt;G e resultados dos testes de associação entre os grupos

rs3802228 A>G		C	IC	IC-I	IC-NI	IC vs C	IC-I vs C	IC-NI vs C	IC-I vs IC-NI
Modelo genético	Genótipo	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
						OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
Codominante	GG	31 (30,4%)	87 (38,3%)	48 (41,0%)	49 (38,0%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	AG	52 (51,0%)	131 (44,5%)	49 (41,9%)	56 (43,4%)	0,25 0,6 (0,4-1,1)	0,24 0,6 (0,4-1,2)	0,35 0,7 (0,4-1,3)	0,6 1,1 (0,6-1,9)
	AA	19 (5,8%)	19 (17,2%)	20 (17,1%)	24 (18,6%)	0,25 0,7 (0,4-1,4)	0,24 0,6 (0,3-1,4)	0,35 0,8 (0,4-1,7)	0,6 1,1 (0,4-2,9)
Dominante	GG	31 (30,4%)	87 (38,3%)	48 (41,0%)	49 (38,0%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	AG + AA	71 (69,6%)	149 (60,6%)	69 (60,0%)	80 (62,0%)	0,11 0,7 (0,4-1,1)	0,11 0,6 (0,4-1,1)	0,22 0,7 (0,4-1,3)	0,68 1,1 (0,7-1,8)
Recessivo	AA	19 (5,8%)	19 (17,2%)	20 (17,1%)	24 (18,6%)	0,87 0,9 (0,5-1,7)	0,76 0,8 (0,4-1,7)	0,97 1,0 (0,5-1,9)	0,85 1,1 (0,4-2,6)
	AG + GG	83 (81,4%)	202 (82,1%)	97 (82,9%)	105 (81,4%)	1,00	1,00	1,00	1,00
Sobredominante	GG + AA	50 (49,0%)	141 (57,3%)	66 (56,4%)	73 (56,6%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	AG	52 (51,0%)	131 (44,5%)	49 (41,9%)	56 (43,4%)	0,16 0,7 (0,4-1,1)	0,27 0,7 (0,4-1,3)	0,4 0,8 (0,5-1,3)	0,77 1,1 (0,6-1,8)
Alélico	A	90 (44,0%)	193 (39,0%)	89 (38,0%)	72 (35,0%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	G	114 (56,0%)	299 (61,0%)	145 (62,0%)	168 (65,0%)	0,23 0,8 (0,6-1,1)	0,20 0,7 (0,5-1,1)	0,002 0,5 (0,4-0,8)	0,07 1,4 (1,0-2,1)

Legenda: Indivíduos com IC isquêmica (IC-I); indivíduos com IC não isquêmica (IC-NI); indivíduos controles (C); casos totais (IC).

Nota: O valor p de significância foi calculado teste qui-quadrado de Pearson para o modelo de codominância e pelo teste exato de Fisher para os demais modelos; indivíduos com IC isquêmica (IC-I); indivíduos com IC não isquêmica (IC-NI); indivíduos controles (C); casos totais (IC).

Fonte: A autora, 2020.

Tabela 10 - Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs699 A&gt;G e resultados dos testes de associação entre os grupos

rs699 A>G		C	IC	IC-I	IC-NI	IC vs C	IC-I vs C	IC-NI vs C	IC-I vs IC-NI
Modelo genético	Genótipo	n	n	n	n	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
		(%)	(%)	(%)	(%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
Codominante	GG	38 (31,4%)	76 (30,6%)	33 (28,2%)	43 (32,8%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	AG	57 (47,1%)	123 (49,6%)	59 (50,4%)	64 (48,9%)	0,88 1,1 (0,7-1,8)	0,75 1,2 (0,7-2,2)	0,75 1,0 (0,6-1,7)	0,66 1,1 (0,6-1,9)
	AA	26 (21,5%)	49 (19,8%)	25 (21,4%)	24 (18,3%)	0,88 0,9 (0,5-1,7)	0,75 1,1 (0,5-2,2)	0,75 0,8 (0,4-1,7)	0,66 1,1 (0,5-2,9)
Dominante	GG	38 (31,4%)	76 (30,6%)	33 (28,2%)	43 (32,8%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	AG + AA	83 (68,6%)	172 (69,4%)	172 (69,4%)	88 (67,2%)	0,97 1,0 (0,6-1,7)	0,58 1,2 (0,7-2,0)	0,80 0,9 (0,5-1,6)	0,68 1,1 (0,7-1,8)
Recessivo	AA	26 (21,5%)	49 (19,8%)	25 (21,4%)	24 (18,3%)	0,67 0,9 (0,5-1,5)	0,98 0,9 (0,5-1,7)	0,52 0,8 (0,4-1,6)	0,77 1,1 (0,4-2,6)
	AG + GG	95 (78,5%)	199 (80,2%)	92 (78,6%)	92 (78,6%)	1,00	1,00	1,00	1,00
Sobredominante	GG + AA	65 (53,7%)	125 (50,4%)	107 (91,5%)	118 (90,8%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	AG	57 (47,1%)	123 (49,6%)	59 (50,4%)	67 (51,1%)	0,55 1,1 (0,7-1,7)	0,52 1,2 (0,7-1,9)	0,82 1,1 (0,6-1,7)	0,85 1,1 (0,4-2,6)
Alélico	A	110 (45,0%)	221 (45,0%)	109 (47,0%)	112 (43,0%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	G	132 (55,0%)	275 (55,0%)	125 (53,0%)	150 (57,0%)	0,23 0,9 (0,7-1,3)	0,24 1,0 (0,7-1,5)	0,26 1,2 (0,8-1,7)	0,4 1,2 (1,8-1,6)

Legenda: Indivíduos com IC isquêmica (IC-I); indivíduos com IC não isquêmica (IC-NI); indivíduos controles (C); casos totais (IC).

Nota: O valor p de significância foi calculado teste qui-quadrado de Pearson para o modelo de codominância e pelo teste exato de Fisher para os demais modelos; indivíduos com IC isquêmica (IC-I); indivíduos com IC não isquêmica (IC-NI); indivíduos controles (C); casos totais (IC).

Fonte: A autora, 2020.

Tabela 11 - Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs378978 C&gt;T e resultados dos testes de associação entre os grupos

rs3789678 C>T		C	IC	IC-I	IC-NI	IC vs C	IC-I vs C	IC-NI vs C	IC-I vs IC-NI
Modelo genético	Genótipo	n	n	n	n	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
		(%)	(%)	(%)	(%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
Codominante	CC	88 (72,7%)	152 (67,7%)	81 (69,8%)	71 (63,4%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	CT	30 (24,8%)	65 (28,5%)	31 (26,7%)	34 (30,4%)	0,38 1,2 (0,8-2,1)	0,5 1,1 (0,6-2,0)	0,17 1,4 (0,8-2,4)	0,3 1,3 (0,7-2,3)
	TT	3 (2,5%)	11 (4,8%)	4 (3,5%)	7 (6,2%)	0,38 2,1 (0,6-7,8)	0,5 1,4 (0,3-6,7)	0,17 3,2 (0,7-13,0)	0,3 2,0 (0,6-7,2)
Dominante	CC	88 (72,7%)	152 (67,7%)	81 (69,8%)	71 (63,4%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	CT + TT	33 (27,3%)	76 (33,3%)	35 (30,2%)	41 (36,6%)	0,29 1,3 (0,8-2,2)	0,62 1,1 (0,6-2,2)	0,12 1,6 (0,9-2,8)	0,28 1,36 (0,8-2,4)
Recessivo	TT	30 (24,8%)	65 (28,5%)	4 (3,5%)	7 (6,2%)	0,28 2,0 (0,5-7,3)	0,66 1,4 (0,3-6,4)	0,15 2,8 (0,7-11,6)	0,31 1,9 (0,5-6,6)
	CT + CC	118 (97,5%)	217 (95,2%)	112 (96,5%)	105 (93,8%)	1,00	1,00	1,00	1,00
Sobredominante	CC + TT	91 (75,2%)	163 (71,5%)	85 (73,3%)	78 (69,6%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	CT	30 (24,8%)	65 (28,5%)	31 (26,7%)	34 (30,4%)	0,46 1,2 (0,7-2,0)	0,73 1,1 (0,6-2,0)	0,31 1,4 (0,7-2,4)	0,52 1,2 (0,7-2,1)
Alélico	C	206 (85,0%)	369 (81,0%)	193 (83,0%)	167 (78,0%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	T	36 (15,0%)	87 (19,0%)	39 (17,0%)	47 (22,0%)	0,16 1,3 (0,9-2,1)	0,56 1,1 (0,7-1,9)	0,05 1,6 (1,0-2,6)	0,16 1,4 (0,9-2,2)

Legenda: Indivíduos com IC isquêmica (IC-I); indivíduos com IC não isquêmica (IC-NI); indivíduos controles (C); casos totais (IC).

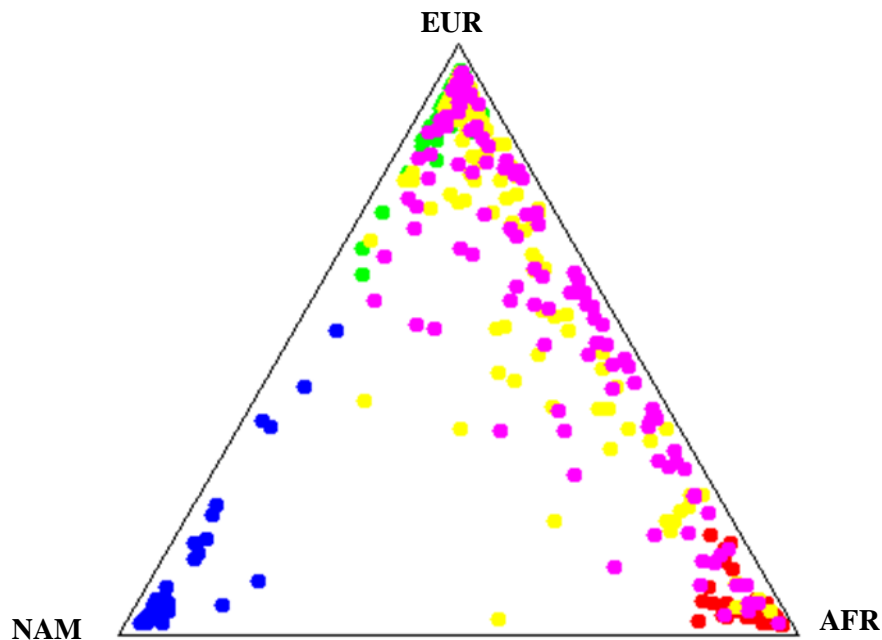
Nota: O valor p de significância foi calculado teste qui-quadrado de Pearson para o modelo de codominância e pelo teste exato de Fisher para os demais modelos.

Fonte: A autora, 2020.

### 3.4 Identificação dos perfis de AIMs-InDels

As informações alélicas, relativas aos marcadores AIMs-InDels, de cada indivíduo foram processadas pelo *software* STRUCTURE v.2.3.4, o qual permitiu a comparação do perfil alélico dos indivíduos a três populações referências (africana, europeia e ameríndia). Os resultados das amostras caso e controle podem ser vistos nas Figuras 11 e 12, respectivamente. A Figura 13, por sua vez, ilustra os marcadores AIMs utilizados no presente estudo.

Figura 11 - Perfil de ancestralidade dos indivíduos pertencentes ao grupo de pacientes com IC



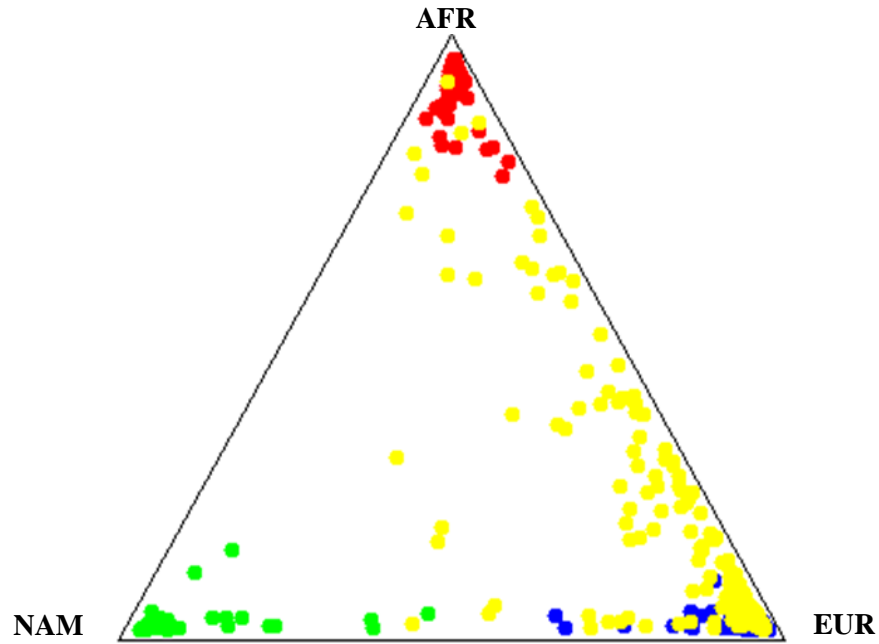
Legenda: População de referência de africanos (AFR); população de referência europeia (EUR); população de referência de ameríndios (NAM). Os indivíduos da população de referência africana estão representados em vermelho; europeus em verde; ameríndios em azul; pacientes de IC isquêmica em amarelo; pacientes de IC não isquêmica em violeta.

Nota: A proximidade de cada vértice do triângulo indica o grau de similaridade com a população de referência.

Fonte: A autora, 2020.



Figura 12 - Perfil de ancestralidade dos indivíduos pertencentes ao grupo de indivíduos controles

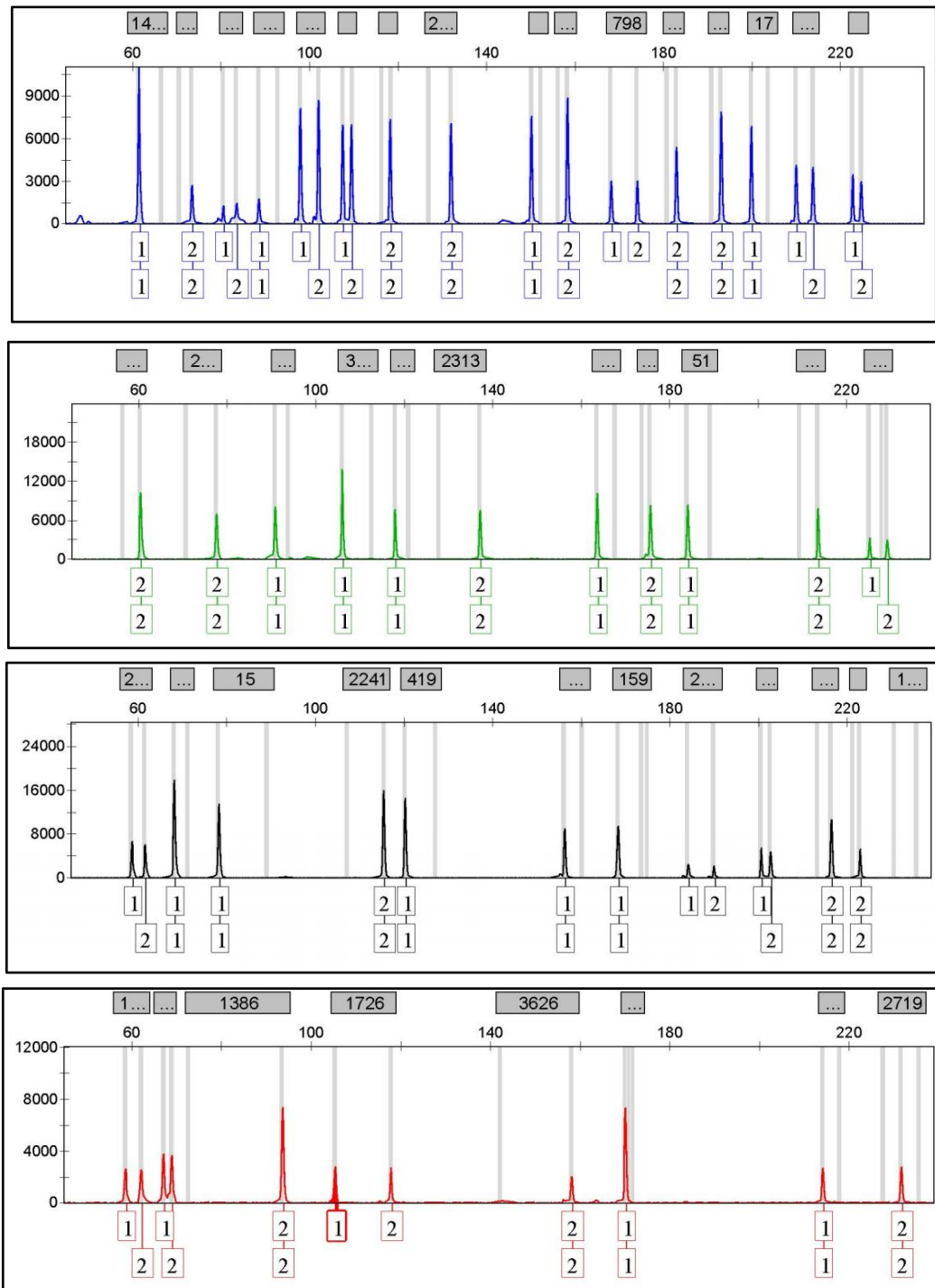


Legenda: População de referência de africanos (AFR); população de referência europeia (EUR); população de referência de ameríndios (NAM). Os indivíduos da população de referência africana estão representados em vermelho; europeus em azul; ameríndios em verde; indivíduos do grupo saudável em amarelo.

Nota: A proximidade de cada vértice do triângulo indica o grau de similaridade com a população de referência.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 13 - Eletroferograma com os marcadores AIMs-InDels



Nota: A Figura ilustra a representação dos alelos presentes nos 46 marcadores de ancestralidade feita pelo *software* GeneMapper v4.1. O eixo x representa o tamanho dos fragmentos e o y, a intensidade da fluorescência. As quatro linhas com picos em cores diferentes indicam o uso de diferentes fluorescências. As caixas em cor cinza indicam a localização de cada locus. Os picos indicam o alelo específico em cada locus.

Fonte: A autora, 2020.

### 3.5 Relações de ancestralidade e polimorfismos com associação

Para as análises posteriores foram excluídos os polimorfismos em que não se verificou associação significativa com a IC. O qui-quadrado de Pearson evidenciou associação significativa do polimorfismo rs3097 C>T, com a IC-I e IC-NI, para os modelos de codominância, dominância, sobredominância e alélico. Em seguida, estratificou-se os resultados dos testes de associação por ancestralidade para o polimorfismo rs3097 C> a fim de compreender se as relações com a IC persistem em cada um dos grupos de ancestralidade majoritária.

#### 3.5.1 Polimorfismo rs3097

Verificou-se a persistência de associação significativa, em relação ao polimorfismo rs3097, nos grupos de indivíduos com ancestralidade europeia (EUR) e miscigenada (MIS). Em relação à ancestralidade europeia, os resultados foram significativos quando comparados os seguintes grupos: pacientes totais com IC *versus* controles ( $p=7,0 \times 10^{-3}$ ), pacientes com IC-I *versus* controles ( $p=0,01$ ) e pacientes com IC-NI *versus* controles ( $p=0,001$ ), adotando-se um modelo de codominância. O modelo de dominância apresentou dados de associação significativos entre pacientes com IC *versus* controles ( $p=8,0 \times 10^{-4}$ ), pacientes com IC-I *versus* controles ( $p=0,02$ ) e pacientes com IC-NI *versus* controles ( $p=4,0 \times 10^{-4}$ ). De igual modo foram vistas relações significativas para o modelo de sobredominância quando comparados pacientes totais com IC *versus* controles ( $p=0,004$ ), pacientes com IC-I *versus* controles ( $p=0,01$ ) e pacientes com IC-NI *versus* controles ( $p=0,004$ ). O modelo alélico, por fim, apresentou associações significativas entre pacientes totais com IC *versus* controles ( $p=0,002$ ) e entre pacientes com IC-NI *versus* controles ( $p=0,001$ ) (Tabela 12). Não foram observados resultados significativos nos grupos de ancestralidade africana para quaisquer dos modelos de herdabilidade adotados (Tabela 13).

Em relação à ancestralidade miscigenada, o resultado foi significativo quando comparados pacientes totais *versus* controles ( $p=0,02$ ) e entre pacientes com IC-I *versus* controles ( $p=0,03$ ), observando-se um modelo de codominância. O modelo de dominância, por sua vez, apresentou resultados significativos para a comparação entre casos totais *versus*

controles ( $p=0,02$ ), além dos pacientes com IC-I *versus* controles ( $p=0,03$ ) (Tabela 14). Os valores de *odds ratio* preveem uma chance aumentada de desenvolvimento da doença em todos os grupos em que se verificou associações estatisticamente significativas, tanto naqueles de ancestralidade majoritariamente europeia, como em miscigenados. Essa chance aumentada, por sua vez, pode ser atribuída à presença do alelo mutante T.

Tabela 12 - Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs3097 C>T e resultados dos testes de associação entre os grupos de ancestralidade europeia

rs3097 (EUR)		C	IC	IC-I	IC-NI	IC vs C	IC-I vs C	IC-NI vs C	IC-I vs IC-NI
Modelos genéticos	Genótipos	n	n	n	n	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
		(%)	(%)	(%)	(%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
Codominante	CC	42 (60,0%)	42 (34,1%)	28 (39,4%)	14 (26,9%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	CT	22 (31,4%)	65 (52,9%)	35 (49,3%)	30 (57,7%)	<b>7,0x10<sup>-3</sup></b> <b>2,9 (1,5-5,6)</b>	<b>0,01</b> <b>2,3 (1,2-4,9)</b>	<b>1x10<sup>-3</sup></b> <b>4,1 (1,8-9,2)</b>	0,04 0,6 (0,3-1,3)
	TT	6 (8,6%)	16 (13,0%)	8 (11,3%)	8 (26,4%)	7,0x10 <sup>-3</sup> 2,7 (0,9-7,4)	0,01 2,0 (0,6-6,3)	<b>1x10<sup>-3</sup></b> <b>4,0 (1,2-13,5)</b>	0,18 0,6 (0,2-2,0)
Dominante	CC	42 (60,0%)	42 (34,1%)	28 (39,4%)	14 (26,9%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	CT + TT	28 (40,0%)	81 (65,9%)	43 (60,6%)	38 3 (73,1%)	<b>8,0x10<sup>-4</sup></b> <b>2,9 (1,6-5,3)</b>	<b>0,01</b> <b>2,3 (1,2-4,5)</b>	<b>4,0x10<sup>-4</sup></b> <b>4,1 (1,9-8,8)</b>	0,17 0,5 (0,3-1,2)
Sobredominante	CC + TT	48 (68,6%)	58 (47,1%)	33 (50,7%)	22 (42,3%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	CT	22 (31,4%)	65 (52,9%)	35 (49,3%)	30 (57,7%)	<b>0,004</b> <b>2,4 (1,3-4,5)</b>	<b>0,01</b> <b>2,4 (1,1-5,1)</b>	<b>0,004</b> <b>2,9 (1,4-6,2)</b>	0,27 1,5 (0,7-3,0)
Alélico	C	106 (76,0 %)	149 (61,0%)	91 (64,0%)	58 (56,0%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	T	34 (24,0%)	97 (39,0%)	51 (36,0%)	46 (44,0%)	<b>0,002</b> <b>2,0 (1,3-3,2)</b>	0,03 1,7 (1,0-3,0)	<b>0,001</b> <b>2,5 (1,4-2,3)</b>	0,18 1,4 (0,8-2,4)

Legenda: Indivíduos de ancestralidade europeia (EUR); indivíduos com IC isquêmica (IC-I); indivíduos com IC não isquêmica (IC-NI); indivíduos controles (C); casos totais (IC).

Nota: O valor p de significância foi calculado teste qui-quadrado de Pearson para o modelo de codominância e pelo teste exato de Fisher para os demais modelos. Indivíduos de ancestralidade europeia (EUR); indivíduos com IC isquêmica (IC-I); indivíduos com IC não isquêmica (IC-NI); indivíduos controles (C); casos totais (IC).

Fonte: A autora, 2020.

Tabela 13 - Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs3097 C>T e resultados dos testes de associação entre os grupos de ancestralidade africana

rs3097 (AFR)		C	IC	IC-I	IC-NI	IC vs C	IC-I vs C	IC-NI vs C	IC-I vs IC-NI
Modelos genéticos	Genótipos	n	n	n	n	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
		(%)	(%)	(%)	(%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
Codominante	CC	5 (71,4%)	15 (51,7%)	6 (54,5%)	9 (50,0%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	CT	2 (28,6%)	14 (48,3%)	5 (45,5%)	9 (50,0%)	0,35	0,47	0,34	0,81
	TT	0,00 -	0,00 -	0,00 -	0,00 -	- -	- -	- -	- -
Dominante	CT + TT	2 (28,6%)	14 (48,3%)	5 (45,5%)	9 (50,0%)	0,35	0,47	0,34	0,81
	CC	5 (71,4%)	15 (51,7%)	6 (54,5%)	9 (50,0%)	1,00	1,00	1,00	1,00
Sobredominante	CC + TT	5 (71,4%)	15 (51,7%)	6 (54,5%)	9 (50,0%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	CT	2 (28,6%)	14 (48,3%)	5 (45,5%)	9 (50,0%)	0,35	0,47	0,34	0,81
Alélico	C	12 (86,0%)	44 (76,0%)	17 (77,0%)	27 (75,0%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	T	2 (14,0%)	14 (24,0%)	5 (23,0%)	9 (25,0%)	0,43	0,53	0,41	0,84

Legenda: Indivíduos de ancestralidade africana (AFR); indivíduos com IC isquêmica (IC-I); indivíduos com IC não isquêmica (IC-NI); indivíduos controles (C); casos totais (IC).

Nota: O valor p de significância foi calculado teste qui-quadrado de Pearson para o modelo de codominância e pelo teste exato de Fisher para os demais modelos.

Fonte: A autora, 2020.

Tabela 14 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs3097 C>T e resultados dos testes de associação entre os grupos de ancestralidade miscigenada

rs3097 (MIS)		C	IC	IC-I	IC-NI	IC vs C	IC-I vs C	IC-NI vs C	IC-I vs IC-NI
Modelos genéticos	Genótipos	n	n	n	n	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
		(%)	(%)	(%)	(%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
Codominante	CC	29 (65,9%)	34 (43,6%)	12 (38,7%)	22 (46,8%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	CT	14 (31,8%)	40 (51,3%)	17 (54,8%)	23 (48,9%)	<b>0,02</b> <b>2,4 (1,1-5,3)</b>	<b>0,03</b> <b>2,9 (1,1-7,8)</b>	0,08 2,1 (0,9-5,1)	0,52 0,7 (0,3-1,9)
	TT	1 (2,3%)	4 (5,1%)	2 (6,5%)	2 (4,3%)	0,02 3,4 (0,4-32,3)	0,03 4,8 (0,4-58,4)	0,08 2,6 (0,2-31,0)	0,52 0,5 (0,1-4,4)
Dominante	CC	29 (65,9%)	34 (43,6%)	12 (38,7%)	22 (46,8%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	CT + TT	15 (34,1%)	44 (56,4%)	19 (61,3%)	25 (53,2%)	<b>0,02</b> <b>2,5 (1,2-5,4)</b>	<b>0,02</b> <b>3,0 (1,2-7,9)</b>	0,06 2,2 (0,9-5,1)	0,48 0,7 (0,3-1,8)
Sobredominante	CC + TT	30 (68,2%)	38 (48,7%)	14 (45,8%)	24 (51,1%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	CT	14 (31,8%)	40 (51,3%)	17 (54,8%)	23 (48,9%)	0,04 2,2 (1,0-4,9)	0,04 2,6 (1,0-6,7)	0,09 2,0 (0,9-4,8)	0,61 0,8 (0,3-2,0)
Alélico	C	72 (82,0%)	108 (69,0%)	41 (66,0%)	67 (71,0%)	1,00	1,00	1,00	1,00
	T	16 (18,0%)	48 (31,0%)	21 (34,0%)	27 (29,0%)	0,03 2,0 (1,0-3,8)	0,03 2,3 (1,1-4,9)	0,09 1,8 (0,9-3,6)	0,49 0,8 (0,4-1,6)

Legenda: Indivíduos de ancestralidade miscigenada (MIS); indivíduos com IC isquêmica (IC-I); indivíduos com IC não isquêmica (IC-NI); indivíduos controles (C); casos totais (IC).

Nota: O valor p de significância foi calculado teste qui-quadrado de Pearson para o modelo de codominância e pelo teste exato de Fisher para os demais modelos. Indivíduos de ancestralidade miscigenada (MIS); indivíduos com IC isquêmica (IC-I); indivíduos com IC não isquêmica (IC-NI); indivíduos controles (C); casos totais (IC).

Fonte: A autora, 2020.

### 3.5.1.1 Associações do polimorfismo rs3097 com a gravidade da IC e com o índice de óbitos

O teste qui-quadrado de Pearson foi novamente realizado para averiguar possível associação deste polimorfismo com a gravidade da doença, independentemente da etiologia. Não se verificou associação do alelo T com as formas graves e não graves da IC ( $p > 0,05$ ) (Tabela 15). Categorizou-se como pacientes graves aqueles com FE inferior a 40%. Os demais foram classificados como “não graves”. Essa categorização foi feita para que fosse possível estimar o valor de *odds ratio*. O mesmo teste foi aplicado para o índice de óbitos e igualmente não foi possível visualizar resultado significativo ( $p > 0,05$ ) (Tabela 16).

Tabela 15 - Associação do alelo T do polimorfismo rs3097 com as formas graves e não graves da IC

RS3097	GRAVIDADE		<i>p</i>	OR (95% IC)
	GRAVE	NÃO GRAVE		
CC	68 (41,7%)	28 (35,0%)	0,33	1,3 (0,7 - 2,3)
CT + TT	95 (58,3%)	52 (65,0%)		

Nota: O valor *p* de significância foi calculado pelo exato de Fisher.  
Fonte: A autora, 2020.

Tabela 16 - Associação do alelo T do polimorfismo rs3097 com o índice de óbitos entre os pacientes

RS3097	ÓBITO		<i>p</i>	OR (95% IC)
	SIM	NÃO		
CC	35 (34,3%)	39 (41,5%)	0,3	0,73 (0,4 - 1,3)
CT + TT	67 (65,7%)	55 (58,5%)		

Nota: O valor *p* de significância foi calculado pelo exato de Fisher.  
Fonte: A autora, 2020.



## 4 DISCUSSÃO

Os polimorfismos genéticos são alvos frequentes de estudos de associação a inúmeras doenças e os relatos daqueles envolvendo a IC estão aumentando na literatura gradativamente. (FEOLA *et al.*, 2017; MARTINELLI *et al.*, 2012; MCNAMARA *et al.*, 2003, 2009; TARDIN *et al.*, 2013; VELLOSO *et al.*, 2010). Os elementos da via renina-angiotensina-aldosterona são um dos principais alvos de estudos de associação envolvendo doenças cardiovasculares e isso se deve sobretudo ao seu papel essencial na regulação da pressão arterial, através da manutenção da homeostase do sódio, da água e do tônus vascular (RIGATTO *et al.* 2004).

No âmbito do SRAA, a aldosterona é o mediador final da via, que ao interagir com receptores específicos nos túbulos renais distais do néfron promove a reabsorção do sódio e da água, aumentando o tônus vascular e a pressão hidroeletrólítica (RUSTER; WOLF, 2006) Porém, já foi estabelecido que a aldosterona também possui atividades extra renais, tendo este hormônio correlação direta com inúmeros processos patológicos, presentes na IC, como por exemplo a fibrose cardíaca (HOROWITZ, 2004; ROULEAU *et al.*, 1994; WEBER, 2001). Portanto, sabendo de sua importância nesse sistema complexo, este hormônio tem ganhado notoriedade em estudos genéticos de associação com doenças de origem cardiovascular.

A aldosterona sintase, por sua vez, é uma enzima responsável pela etapa final de biossíntese da aldosterona e já existem estudos que conseguiram associar SNPs presentes no gene que codifica essa enzima (*CYP11B2*) com doenças cardiovasculares. O SNP mais consagrado é o - 344C>T por exemplo (CHOU *et al.*, 2016; KUPARI *et al.*, 1998; KURLAND *et al.*, 2002). Existem estudos, ainda, que correlacionaram polimorfismos genéticos presentes neste gene com o aumento da pressão arterial em populações multiétnicas (BARBATTO *et al.*, 2004), com o aumento do ventrículo direito (KUPARI *et al.*, 2008) e com o aumento da fibrilação atrial em pacientes portadores de IC (AMIR *et al.*, 2008).

Além da aldosterona, outro elemento muito explorado é o angiotensinogênio. Este é um peptídeo sintetizado no fígado que atua como substrato da renina para a síntese de angiotensina I. E, existem estudos que correlacionaram SNPs presentes no gene que o codifica, com a hipertensão arterial (FANG *et al.*, 2010; WATKINS *et al.*, 2010) e com a hipertensão gestacional, por exemplo (XUN *et al.*, 2016).

Portanto, é possível perceber que muitas doenças podem ser o reflexo de vários fatores genéticos e ambientais que interagem entre si. E no âmbito genético, especificamente,

observa-se a atuação de polimorfismos genéticos como marcadores ou fatores de risco para o desenvolvimento de uma determinada patologia.

Tendo em vista esse fator, atualmente o uso e aperfeiçoamento de técnicas de modelagem molecular tem sido bastante úteis e promissoras em prever quais variantes polimórficas são capazes de gerar alguma alteração na conformação e na expressão de proteínas nativas. Dentro desse cenário, tem-se por exemplo o estudo de Jia *et al.* (2014) que indicou alterações significativas, ocasionadas por determinados polimorfismos, sobre a estrutura e a síntese da aldosterona sintase, abrindo caminhos, portanto, para o desenvolvimento de estudos de associação, que poderão prever se essas alterações podem de fato exercer algum impacto significativo na clínica. Além do trabalho de Jia *et al.* (2014), há o trabalho de Tiffin *et al.* (2010), que também contou com o auxílio dessas ferramentas computacionais para identificar genes e variantes genéticas que podem ter alguma relação com a hipertensão associada ao consumo de *sal*.

O estudo de Jia *et al.* (2014) apontou um conjunto de polimorfismos com efeito possivelmente deletério. No entanto, desse conjunto apenas o rs3097 C>T exibiu alguma possibilidade de associação com a IC em nosso trabalho. Os polimorfismos rs72554626, rs5317, rs146655862 e rs5315, que foram vistos por Jia *et al.* (2014) como fortes candidatos a fatores de risco no desenvolvimento de doenças de origem cardiovascular, apresentaram um comportamento monomórfico em nosso estudo. Isso sugere que eles não são suficientemente polimórficos, talvez por uma questão de seleção natural. Essas variantes previstas por Jia *et al.* (2014) e que tiveram uma elevada associação deletéria, talvez possam influenciar no aparecimento de condições que promovam, por exemplo uma menor sobrevida no grupo de indivíduos em que essas variantes deletérias são encontradas. Mas essa hipótese precisa ser testada em estudos futuros.

#### 4.1 Dados demográficos e clínicos das amostras

As médias de idade foram estatisticamente distintas entre os pacientes com IC e indivíduos controles ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1). A chance de seleção de amostras com características diferentes quanto à idade diminuir as associações observadas no estudo é improvável, uma vez que o número de internações por IC é maior na faixa etária de 50 a 69 anos e o percentual de indivíduos da população do Estado do Rio de Janeiro que foram internados é de apenas 0,32%, segundo dados do IBGE e do DATASUS (2014). Isso sugere que existe uma probabilidade ínfima de associações espúrias entre as amostras utilizadas nesse estudo. Outro fato não menos importante, e que deve ser levado em consideração, é a comprovada maior incidência da IC em idades mais avançadas (JUGDUTT, 2010).

A média de idade no momento do diagnóstico também variou entre pacientes com IC-I e IC-NI e essa diferença foi estatisticamente significativa (IC-I =  $54,6 \pm 10,6$  versus IC-NI =  $49,5 \pm 13,9$ ,  $p < 0,05$ ) (Tabela 1). Isso sugere que a IC-I talvez seja diagnosticada mais tardiamente na vida dos indivíduos afetados que a IC-NI. Bui, Horwich e Fonarow (2011) demonstraram que a incidência de IC-I aumenta consideravelmente com a idade, sendo mais incidente em idades mais avançadas. Ziaeeian e Fonarow (2016) também indicaram essa relação direta da idade com a IC em geral.

Paralelamente, o tempo (em anos) de convivência com a IC desde o momento do diagnóstico foi significativamente maior em indivíduos com IC-NI que naqueles com IC-I, no presente estudo (IC-NI =  $18,7 \pm 5,8$  versus IC-I =  $12,9 \pm 2,8$ ,  $p < 0,01$ ) (Tabela 1). Esse resultado está de acordo com a revisão de Follath (1999), que previu um melhor prognóstico, assim como uma menor mortalidade em pacientes acometidos com IC-NI, quando comparados com aqueles com IC-I. Contudo, não se observou diferenças estatisticamente significativas relativas ao índice de óbitos e da gravidade da doença entre os grupos de pacientes em nosso estudo. A gravidade foi categorizada de acordo com a FE ventricular. Pacientes com FE  $< 30\%$  foram classificados como acometidos por IC grave, aqueles com  $30\% < FE < 40\%$  foram categorizados como acometidos por IC moderada e por fim, aqueles com FE  $> 40\%$ , foram definidos como pacientes portadores de IC leve. Para fins de cálculo de *odds ratio*, obtidos nos testes de associação realizados posteriormente, ajustamos essa classificação de forma a obter apenas dois grupos de pacientes: graves versus não graves. Dessa forma, foi possível elucidar se existe um risco relativo associado com algum polimorfismo para o desenvolvimento de formas mais graves da doença.

Em relação à presença de comorbidades, não foram observadas diferenças relevantes entre os grupos de pacientes quando analisada a ocorrência de HAS. Uma vez que apenas indivíduos sem HAS, foram selecionados para compor o grupo controle, não se realizou testes estatísticos comparando os grupos de casos e controle. Por outro lado, houve diferenças significativas em relação à presença de dislipidemia. Observou-se que os indivíduos com IC-I exibiram um perfil de dislipidemia mais acentuado que os não isquêmicos. Esse dado concorda com o estudo de Lourenço *et al.* (2011) que também previu uma maior incidência de dislipidemia, dentre outras comorbidades em indivíduos com IC-I. O mesmo estudo não viu diferenças estatisticamente significativas em relação à FE e esse resultado também coincide com o observado em nosso trabalho. A maior observância de casos de dislipidemia no grupo isquêmico pode ser esperada, devido à etiologia da doença e ao risco comprovadamente aumentado de indivíduos com dislipidemias sofrerem um quadro de IC isquêmica (JEPPESEN *et al.*, 1997).

Houve uma maior incidência de indivíduos do sexo masculino nas amostras de pacientes com IC tanto isquêmica (75,21%) como não isquêmica (58,02%), enquanto na população de indivíduos controles se observou incidência maior de mulheres (58,2%) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1). Esses dados são compatíveis com o perfil da população saudável geral do estado do Rio de Janeiro em que as mulheres representam 52,7% desta população, segundo o IBGE (2010). Paralelamente, a prevalência de homens nos grupos de pacientes corrobora dados da literatura que preveem uma maior incidência de IC em indivíduos do sexo masculino (STROMBERG; MARTENSSON, 2003).

Os dados de equilíbrio de Hardy-Weinberg são importantes porque indicam se a população estudada está em equilíbrio gênico. Essa variante indica por exemplo, se os polimorfismos estudados estão sendo afetados por fatores evolutivos. Caso as frequências genotípicas estejam fora do equilíbrio esperado, os resultados dos testes de associação poderiam ser o reflexo dessa pressão evolutiva natural. Contudo, todos os polimorfismos incluídos no presente estudo estão em equilíbrio gênico (Tabela 2). Apenas o rs3802228 encontrou-se fora do equilíbrio de HW para o grupo controle, de acordo com os resultados fornecidos pelo *software* Arlequin. Porém, o valor “p” tangenciou o limite de 5% esperado. Além disso, ao aplicarmos o teste qui-quadrado de Pearson pela ferramenta SNPStats não se reproduziu esse mesmo resultado, viabilizando descartar a hipótese de desequilíbrio.

#### 4.2 Comparação dos perfis genotípicos e de ancestralidade entre as populações estudadas

O *software* Arlequin foi utilizado para o cálculo dos valores “p” de não diferenciação entre duas ou mais populações específicas, a partir da comparação das frequências alélicas dos polimorfismos rs3097, rs3802228, rs699 e rs3802228. Os resultados foram positivos para a comparação entre controles *versus* pacientes com IC-I ( $p= 0,003$ ) e controles *versus* pacientes com IC-NI ( $p= 0,001$ ). Porém, a mesma diferença não foi observada entre os grupos de IC-I e IC-NI ( $p= 0,53$ ) (Tabela 3). Isso sugere, portanto, que existe uma diferença significativa no perfil genotípico desses marcadores entre a população de casos e controles, que pode ou não, ter alguma relação com o fenótipo da doença e que, por fim, em termos desses marcadores, os indivíduos isquêmicos e não isquêmicos não diferem entre si.

É possível observar na Tabela 1 que existe uma maior prevalência de indivíduos com ancestralidade europeia nas populações de casos e controles. Esse fator está em sincronia com o estudo de Manta *et al.* (2013) e Santos *et al.* (2010), os quais demonstraram que a população do Rio de Janeiro é composta por uma maior proporção de indivíduos com ancestralidade europeia. Apesar disso, é nítido um percentual mais elevado de indivíduos com ancestralidade africana e miscigenada nos grupos de pacientes com IC de etiologia não isquêmica. A maior observância de indivíduos com ancestralidade africana nesse grupo, em relação aos controles corrobora os resultados de Bahami *et al.* (2008) que indicaram um risco aumentado de afrodescendentes no desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva, quando comparados a outros grupos étnicos. Além disso, outro estudo também demonstrou que indivíduos afrodescendentes possuem maiores chances de desenvolver hipertensão (LIU *et al.*, 2014).

Contudo, a associação mais forte de doenças cardiovasculares com indivíduos afrodescendentes pode ser decorrente de outras variáveis como por exemplo a variante social, uma vez que a maior parte dos indivíduos com baixa renda econômica é composta pela população negra e miscigenada, que não possui as mesmas condições de acesso a programas assistenciais de saúde e de prevenção de doenças. Todavia, apesar do grande fator social, os resultados disponíveis neste estudo e na literatura não devem ser menosprezados.

O teste qui-quadrado de Pearson permitiu a observação de resultados significativos, em relação ao polimorfismo rs3097. As relações de maior significância foram vistas entre controles *versus* pacientes com IC-I ( $p=0,0009$ ) e entre casos *versus* controles totais

( $p=0,0002$ ). Contudo, também foram observadas diferenças, apesar de menos significativas, entre controles *versus* pacientes com IC-NI ( $p=0,046$ ) (Tabela 4).

O teste exato e os valores de Fst, por sua vez, reforçaram os resultados do qui-quadrado em relação ao polimorfismo rs3097. Em relação a estes testes os resultados foram significativos quando comparados pacientes com IC-I *versus* controles ( $p=0,003$ ), pacientes com IC-NI *versus* controles ( $p=0,001$ ) e entre casos *versus* controles totais ( $p=2 \times 10^{-4}$ ). Além do rs3097, o teste exato também previu um certo nível de associação significativa em relação ao rs3802228 e alguns grupos, a saber: pacientes com IC-I *versus* controles ( $p=0,01$ ) e pacientes totais *versus* controles totais ( $p=0,02$ ) (Tabela 5).

A soma dos dados fornecidos por estes dois testes estatísticos direcionou as análises subsequentes para o estudo de possíveis associações dos polimorfismos rs3097 e rs3802228 com os grupos de casos e controles. Interessantemente, ambos os polimorfismos pertencem ao gene da aldosterona sintase, evidenciando a importância deste gene para a manutenção da homeostase cardiovascular. Não foram verificadas associações em relação aos polimorfismos do gene codificador do angiotensinogênio.

#### 4.3 Frequências do polimorfismo rs3097 C>T e suas associações com a IC

Os resultados da análise do polimorfismo rs3097 indicaram uma frequência genotípica do homocigoto selvagem (CC) significativamente maior em indivíduos controles (63,1%) que em pacientes portadores de IC-I (41,0%) e IC-NI (38,5%). De igual modo o valor  $p$  também revelou uma associação significativa desse polimorfismo em relação a casos gerais *versus* controles, pacientes com IC-I *versus* controles e pacientes com IC-NI *versus* controles, para todos os modelos de herdabilidade adotados, com exceção do modelo de recessividade (Tabela 8). Esses dados indicam uma forte associação do alelo T, que é o alelo mutante, com a IC.

Contudo, sabendo-se da elevada miscigenação da população brasileira, também foram feitos testes estatísticos estratificando estes resultados de acordo com a ancestralidade mensurada para cada indivíduo. Os resultados dessa estratificação, por sua vez, indicaram uma maior prevalência do alelo T em indivíduos de ancestralidade europeia (Tabela 12), o que coincide com os dados de frequência populacional do “*The Single Nucleotide Polymorphism Database*” (ddSNP)”, que prevê uma prevalência do alelo T em europeus em

relação aos demais grupos étnicos. Consequentemente, o resultado significativo observado no grupo de indivíduos com ancestralidade majoritariamente europeia, poderia ser fruto de estratificações populacionais, ocasionadas por diferentes padrões de migração entre povos de ancestralidade distinta ao longo do tempo.

Esta diferença significativa entre amostras de pacientes e controles sugere um modelo de codominância, dominância, sobredominância ou alélico em que a presença do alelo T no polimorfismo rs3097 C>T do gene *CYP11B2* esteja associada a uma chance mais elevada de desenvolvimento da IC na população brasileira. O teste de *odds ratio* calculado para todas as associações realizadas grupo a grupo, permitiu a constatação de uma chance aumentada de desenvolvimento da IC em geral.

#### 4.4 Impactos do polimorfismo rs3097 C>T na IC

Ainda não existem estudos que expliquem os mecanismos envolvidos na correlação existente entre o polimorfismo rs3097 C>T e a IC. Contudo, sabe-se que este SNP está presente na região 3'UTR do mRNA. Tanto as regiões 5' e 3' são responsáveis pela regulação do mRNA e consequentemente em uma maior ou menor expressão gênica. Jia *et al.* (2014) sugeriram, por meio de ferramentas de modelagem computacional que o polimorfismo rs3097 C>T poderia alterar os sítios de ligação à micro RNAs (miRNAs) na sequência do RNAm.

Os miRNAs podem promover a repressão da tradução ou a degradação do mRNA (REINHART *et al.*, 2002). Quando um miRNA pareia com o seu mRNA cognato, e passa a compor o RISC, um complexo proteico cujo principal componente é uma endonuclease, induz esse complexo RISC a clivar o mRNA, impedindo, portanto, o seu reconhecimento pelos ribossomos e consequente tradução. Dessa forma, é possível imaginar que a presença de polimorfismos nessas regiões UTR podem tanto criar sítios de ligação a miRNAs como extinguir sítios outrora existentes (GREGORY; SHIEKHATTAR, 2005).

As ferramentas computacionais utilizadas por Jia e *et al.* (2014) não esclareceram se esse SNP é capaz de criar ou extinguir sítios de ligação específicos a miRNAs, mas em qualquer uma das hipóteses o impacto na biossíntese da aldosterona sintase estaria estabelecido. Uma vez que já está bem esclarecido que a aldosterona quando secretada em níveis anormais aos limites fisiológicos pode gerar inúmeras alterações fisiopatológicas no sistema cardiovascular, pode-se sugerir, portanto, que esse polimorfismo poderia estar

influenciando em uma maior secreção da aldosterona circulante nesses pacientes com IC. Contudo, essa hipótese ainda precisa ser testada em estudos futuros.

O rs3097 C>T também já foi correlacionado com o aumento da espessura do músculo cardíaco (MAYOSI *et al.*, 2003). Além disso, Jia *et al* (2014) previram que o rs3097 C>T possivelmente é capaz de alterar sítios de ligação do hsa-miR-299-3p no RNA mensageiro. Este miRNA, em especial, foi associado com a modulação da senescência em células endoteliais por Jong *et al* (2013). Outro estudo também previu o aumento da expressão de um conjunto de miRNAs em pacientes com IC, e dentre estes encontra-se o hsa-miR-299-3p, indicando que existe uma elevada possibilidade de esse miRNA ter alguma relação com o desenvolvimento da IC (CAKMAK *et al.*, 2015).

Em síntese, até o presente momento não existem estudos que se propuseram a caracterizar as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos da aldosterona sintase incluídos em nosso trabalho na população brasileira e tampouco, associá-los com a IC. Por isso, acredita-se que o impacto do presente estudo esteja no pioneirismo evidenciado na caracterização desses polimorfismos na população do Rio de Janeiro e em suas relações com a ancestralidade e com o desfecho de IC.



## CONCLUSÕES

Os dados apresentados no presente estudo, nos permitem concluir que:

- a) as frequências do polimorfismo rs3097 C>T presente no gene *CYP11B2* variaram entre as amostras de casos e controles conforme seu padrão de ancestralidade, sendo o alelo T e o genótipo TT mais prevalente em indivíduos com predominância de ancestralidade europeia;
- b) foi constatada uma associação do alelo T do polimorfismo rs3097 C>T estatisticamente significativa com a IC-I e IC-NI, mais especificamente em indivíduos com ancestralidade com predominância europeia;
- c) em relação aos demais polimorfismos, não foram encontrados resultados estatisticamente significativos que pudessem sugerir uma associação com a IC isquêmica ou não isquêmica.

Este trabalho contribuiu para a caracterização dos polimorfismos rs3097 C>T, rs3802228 A>G, rs699 A>G e rs3789678 C>T na população do estado do Rio de Janeiro, e para a associação destes polimorfismos com a IC, contando com o auxílio de ferramentas moleculares de ancestralidade para a eliminação de associações espúrias.

Os resultados evidenciaram associações sugestivas do polimorfismo rs3097 C>T, presente no gene da aldosterona sintase, com o quadro de IC, seja isquêmica ou não isquêmica. Portanto, as perspectivas futuras para este trabalho é a inclusão de novos polimorfismos deste gene e de outros genes que possam estar relacionados com os mecanismos fisiopatológicos desencadeantes da IC e de outras alterações cardiovasculares, em estudos futuros de associação.

## REFERÊNCIAS

- ALLEPHARMA. **New Technologies in Life Science**. 2018. Disponível em: <<http://www.allepharma.com/para-novos-medicamentos-busque-os-pioneiros/renina-angio/>>. Acesso em: 17 dez. 2019
- ALBUQUERQUE D. C. *et al.*; Estudo BREATHE. I Brazilian Registry of Heart Failure - Clinical Aspects, Care Quality and Hospitalization Outcomes. **Arq Bras Cardiol**. v. 104, n. 6, p. 433-442, 2015.
- AMIR, O. *et al.* Aldosterone synthase gene polymorphism as a determinant of atrial fibrillation in patients with heart failure. **Am J Cardiol**, v. 102, n. 3 p. 326-329, 2008.
- BAHAMI, H. *et al.* Differences in the Incidence of Congestive Heart Failure by Ethnicity: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Arch Intern Med.**, v. 168, n.9, p. 2138-2145.
- BASHIRULLAH, A.; COOPERSTOCK, R. L.; LIPSHITZ, H. D. Spatial and temporal control of RNA stability. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 98, n. 13, p. 7025-7028, 2001.
- BATTERSBY, M. D.; GLENNER, M. D.; Familial cardiomyopathy. **Am J med**, v. 30, n. 3, p. 382-291, 1961.
- BOLLAG, W. B. Regulation of Aldosterone Synthesis and Secretion. **Compr Physiol**. v. 4, n. 3, p. 1017-1055, 2014.
- BRASIL. Departamento de Informática do SUS. **Incidência de morbidade no Brasil**. 2014. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 25 nov. 2019.
- BRIGDEN, W.; ROBINSON, J. Alcoholic heart disease. **Br Med J**, v. 2, n. 5420, p. 1283–1289, 1964.
- BROWN, M. A. *et al.* Primary hyperaldosteronism: A missed diagnosis in ‘essential hypertensives’? **Aust NZ J Med**, v. 26, n. 4, p. 533-538, 1996.
- BUI, A. L.; HORWICH, T. B.; FONAROW, G. C. Epidemiology and risk profile of heart failure. **Nat Rev Cardiol.**, v. 8, n. 1, p. 30–41, 2011.
- CAKMAK, H. A. *et al.* The prognostic value of circulating microRNAs in heart failure: preliminary results from a genome-wide expression study. **J Cardiovascular Med.**, v. 16, n. 6, p. 431-437, 2015.
- CAO, F. *et al.* Associations of the genetic polymorphisms in *CYP11B2* gene with nonfamilial structural atrial fibrillation. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v. 30, n. 10, p. 1069–1072, 2009.
- CARTHEW, R. W. Gene regulation by microRNAs. **Curr Opin Genet Dev.**,v. 16, n. 2, p. 203-208, 2006.

CHOU, C. H. *et al.* Relationship of Genetic Polymorphisms of Aldosterone Synthase Gene Cytochrome P450 11B2 and Mineralocorticoid Receptors with Coronary Artery Disease in Taiwan. **Int J Med Sci**, v. 13, n. 2, p. 117-123, 2016.

COMITÊ COORDENADOR DA DIRETRIZ BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA DE INSUFICIÊNCIA AGUDA E CRÔNICA. Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica e Aguda. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.111, n.3, p.436-539. 2018. Disponível em: <<http://publicacoes.cardiol.br/portal/abc/portugues/2018/v11103/pdf/11103021.pdf>> . Acesso em: 26 nov. 19.

CONNELL, J. *et al.* The impact of polymorphisms in the gene encoding aldosterone synthase (*CYP11B2*) on steroid synthesis and blood pressure regulation. **Mol Cell Endocrinol**, v. 217, n. 1-2, p. 243-247, 2004.

DEC, G. W.; FUSTER, V. Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. **N Engl J Med**, v. 331, n. 23, p. 1564–1575, 1994.

DUNN, O. J. Multiple comparison among means. **J Am Stat Assoc**, v. 56, n. 293, p. 52–64, 1961.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): na integrated *software* package for population genetics data analysis. **Evol Bioinform Online**, v. 1, p. 47-50, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2658868/> > Acesso em: 25 nov. 2019.

FANG, H. J. *et al.* Linkage of Angiotensinogen Gene Polymorphisms with Hypertension in a Sibling Study of Hong Kong Chinese. **J hipertens.**, v. 28, n. 6, p. 1203–1209, 2010.

FEOLA, M. *et al.* Prognostic Value of Different Allelic Polymorphism of Aldosterone Synthase Receptor in a Congestive Heart Failure European Continental Ancestry Population. **Archives of Medical Research**, v. 48, n. 2, p. 156-161, 2017.

FOLLATH, F. Nonischemic heart failure: epidemiology, pathophysiology, and progression of disease. **J Cardiovasc Pharmacol**. v. 33, n. 3, p. S31-S35, 1999.

GHEORGHIADÉ, M. *et al.* Pathophysiologic targets in the early phase of acute heart failure syndromes. **Am J Cardiol**, v. 96, n. 6A, p. 11G-17G, 2005.

GREGORY, R.I.; SHIEKHATTAR, R. MicroRNA biogenesis and cancer. **Cancer Res**, v. 65, n. 9, p. 3509-3512, 2005.

GRIBOUVAL, O. *et al.* Mutations in genes in the renin-angiotensin system are associated with autosomal recessive renal tubular dysgenesis. **Nat Genet**, v. 37, n. 9, p. 964-968, 2005.

GUBLER, M. C.; ANTIGNAC, C. Renin-angiotensin system in kidney development: renal tubular dysgenesis. **Kidney Int.**, v. 7, n. 5, p. 400-406, 2010.

HATTANGADY, N. *et al.* Acute and chronic regulation of aldosterone production. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 350, n. 2, p. 151-162, 2012.

- HOROWITZ, S. Miocardiopatia dilatada: manejo clínico. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, n. 1, p. 1-3, 2004. Disponível em: <<http://sociedades.cardiol.br/sbc-rs/revista/2004/01/artigo09.pdf>> . Acesso em: 25 nov. 2019.
- IBGE. **Brasil: 500 anos de povoamento = Brazil: 500 years of settlement**. Rio de Janeiro: IBGE: 232. 2000. Censo 2010. Disponível em: <<http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?dados=26&uf=33>> . Acesso em: 25 nov. 2019.
- JANSEN, R. P. mRNA localization: message on the move. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 2, n. 4, p. 247-256, 2001.
- JEPPESEN, J. et al. Relation of High TG–Low HDL Cholesterol and LDL Cholesterol to the Incidence of Ischemic Heart Disease: An 8-Year Follow-up in the Copenhagen Male Study. **AHA journals**, v. 17, n. 6, p. 1114-1120, 1997.
- JIA, M. *et al.* Computational Analysis of Functional Single Nucleotide Polymorphisms Associated with the *CYP11B2* Gene. **Plos One**, v. 9, n. 8, p. e104311, 2014.
- JUNG, H. J; SUH Y. Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. 472, p.472, 2014.
- JONG, H-L. *et al.* MicroRNA 299-3p modulates replicative senescence in endothelial cells. **Physiol Genomics**, v. 45, n. 7, p. 256-267, 2013.
- JUGDUTT, B. I. Heart failure in elderly: advances and challenges. **Expert Ver Cardiovasc Ther.**, v.8, n.5, p.695-715, 2010.
- KAYSER, M; de KNIJFF, P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. **Nat Rev Genet.**, v. 12, n. 3, p. 179–192, 2011.
- KORESSAAR, T; REMM, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. **Bioinformatics**, v,23, n.10, p.1289-91, 2007.
- KUPARI, M. *et al.* Associations Between Human Aldosterone Synthase (*CYP11B2*) Gene Polymorphisms and Left Ventricular Size, Mass, and Function. **Circulation**, v. 97, n. 6, p. 569–575, 1998.
- KURLAND, L. *et al.* Aldosterone synthase (*CYP11B2*) -344 C/T polymorphism is related to antihypertensive response\*: Results from the swedish irbesartan left ventricular hypertrophy investigation versus atenolol (SILVHIA) trial. **Am J Hiperension**, v. 15, n. 5, p. 389–393, 2002.
- LEVY, D. *et al.* Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. **N Engl J Med**, v. 322, n. 22, p. 1561–1566, 1990.
- LIMA, S. G.; HATAGIMA, A.; SILVA, L. C. N. Sistema renina-angiotensina: é possível identificar genes de suscetibilidade à hipertensão?. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 89, n. 6, p. 389-395, 2007.

- LIU, L. *et al.* Burden of cardiovascular disease among multi-racial and ethnic populations in the United States: an update from the National Health Interview Surveys. *Front. Cardiovasc. Med.*, v.1, n.8, p.1-8, 2014.
- LIJNEN, P.; PETROV, V. Induction of Cardiac Fibrosis by Aldosterone. *J Mol Cell Cardiol.*, v.32, n.6, p.865-879, 2000.
- LINS, T. C. *et al.* Genetic heterogeneity of self-reported ancestry groups in an admixed Brazilian population. *J Epidemiol*, v. 21, n. 4, p. 240-245, 2011.
- LOPEZ-SENDÓN J., MONTORO N. The changing landscape of heart failure outcomes. *Medicographia*, v. 37, n. 2, p. 125-134, 2015.
- LOURENÇO, C. *et al.* Ischemic versus non-ischemic cardiomyopathy--are there differences in prognosis? Experience of an advanced heart failure center. *Rev Port Cardiol.*, v. 30, n. 2, p.181-197, 2011.
- MANN, D. L. *et al.* Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. 10th ed. Philadelphia: Elsevier, 2014. 486p.
- MANTA, F. S. *et al.* Analysis of genetic ancestry in the admixed population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. *Ann Hum Biol*, v. 40, n. 1, p. 94-98, 2013.
- MARTINELLI, N. C. *et al.* Polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene in systolic heart failure: a haplotype analysis. *Nitric Oxide*, v. 26, n. 3, p. 141-147, 2012.
- MAYOSI, B. *et al.* Measured haplotype analysis of the aldosterone synthase gene and heart size. *Eur J Hum Genet*, v. 11, p. 395-401, 2003. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/5200967>> . Acesso em: 25 nov. 2019.
- MCNAMARA, D. M. *et al.* Effect of the Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. *Circulation*, v. 107, n. 12, p. 1598-1602, 2003.
- MCNAMARA, D. M. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) polymorphisms in African Americans with heart failure: results from the A-HeFT trial. *J Card Fail.*, v. 15, n. 3, p. 191-198, 2009.
- MCPHERSON, R.; TYBJAERG-HANSEN, A. Genetics of Coronary Artery Disease. *Circulation Res.*, v. 118, n. 4, p. 564-578, 2016.
- MESQUITA, E. *et al.* Understanding Hospitalization in Patients with Heart Failure. *IJCS*, v. 30, n. 1, p. 81-90, 2017.
- MILLER, S. A. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.
- MORITA, H.; SEIDMAN, J.; SEIDMAN, E. C. Genetic causes of human heart failure. *Jour Clin Inv.*, v. 115, n. 3, p. 518-526, 2005.

MOZAFFARIAN, D. *et al.* Executive summary: heart disease and stroke statistics – 2015 update: a report from the american heart association. **Circulation**, v.131, n.4, p.434-441, 2015.

MORRIS, S. *et al.* Pathophysiological Insights Into the Cardiomyopathy of Chagas' Disease. **Circulation**, v. 82, n-6, p. 1900-1909, 1990.

NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE. HUGO Gene Nomenclature Committee. **CYP11B2 cytochrome P450 family 11 subfamily B member 2 [*Homo sapiens* (human)]**. Bethesda, MD: NCBI, 2018a. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1585>>. Acesso em: 27 mar. 2018.

NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE. HUGO Gene Nomenclature Committee. **AGT angiotensinogen [*Homo sapiens* (human)]**. Bethesda, MD: NCBI, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/183>>. Acesso em: 27 mar. 2018b.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **Primer tools**. c2005. Disponível em: <<https://www-s.nist.gov/dnaAnalysis/>> . Acesso em: 01 maio 2018.

O'KEEFE, J. H.; ABUISSA, H.; PITT, B. Eplerenone improves prognosis in postmyocardial infarction diabetic patients with heart failure: Results from EPHEBUS. **Diabetes Obes Metab.**, v.10, n.6 p. 492-497, 2007.

PATEL, S. *et al.* Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): the ubiquitous system for homeostasis and pathologies. **Biomed & Pharm**, v. 94, p. 317-325, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332217324447>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

PENA, S. D. *et al.* The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011.

PEREIRA, R. W.; PENA, S. D. Phylogeography of haplotypes of five microsatellites located in a low-recombination region of the X chromosome: studies worldwide and in Brazilian populations. **Genetica.**, v. 126, n. 1-2, p. 243-250, 2006.

PERSSON, B. P. Renin: origin, secretion and synthesis. **J Physiol**, v. 552, n. 3, p. 667–671, 2003.

PITT, B. *et al.* The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. **N Engl J Med.**, v. 341, n. 10, p. 709-717, 1999.

PORTRAT-DOYEN, S. *et al.* Isolated Aldosterone Synthase Deficiency Caused by Simultaneous E198D and V386A Mutations in the *CYP11B2* Gene 1. **The J of clinical endoc and metab**, v. 83, n. 11, p. 4156-4161, 1998.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

QUACK, I.; VONEND, O.; RUMP, L. C. Familial hyperaldosteronism I-III. **Horm Metab Res.**, v. 42, n. 6, p. 424-428, 2010.

REINHART, B. *et al.* MicroRNAs in plants. **Genes Dev.**, v. 16, n. 13, p. 1616-1626, 2002.

RIGATTO, K. V.; BOHLKE, M.; IRIGOYEN, M. C. Sistema renina angiotensina: da fisiologia ao tratamento. **Rev Soc Cardiol do Rio Grande do Sul.**, v. 3, p. 1-5, 2004. Disponível em: <<http://sociedades.cardiol.br/sbc-rs/revista/2004/03/artigo01.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

ROGERSON, F. *et al.* Presence of angiotensin converting enzyme in the adventitia of large blood vessels. **J Hypertens.**, v. 10, n. 7, p. 615-620, 1992.

ROSSI, G. P.; SECCIA, T. M.; PESSINA, A. C. Primary aldosteronism - part I: Prevalence, screening, and selection of cases for adrenal vein sampling. **J Nephrol.**, v. 21, n. 4, p. 447-454, 2008.

ROULEAU, J. L. *et al.* Prognostic value of neurohumoral activation in patients with an acute myocardial infarction: effect of captopril. **J Am Coll Cardiol.**, v. 24, n. 3, p. 583-591, 1994.

ROUSSET, F.; RAYMOND, M. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics*, v. 140, n. 4, p. 1413-1419, 1995.

RUSTER, C.; WOLF, G. Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Progression of Renal Disease. **J AM Soc Nephrol**, v. 17, n. 11, p. 2985-2991, 2006.

SADOSHIMA, J.; IZUMO, S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: critical role of the AT1 receptor subtype. **Circ Res.**, v. 73, n. 3, p. 412-423, 1993.

SAMAVAT, S.; AHMADPOOR, P.; SAMADIAN, F. Aldosterone, hypertension, and beyond. **Iran J Kidney Dis.**, v. 5, n. 2, p. 71-76, 2011.

SANTOS, R. A.; FAGUNDES-MOURA, R. C.; SILVA, S. A. C. Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. **Rev Bras Hipertens.**, v. 3, p. 227-236, 2000. Disponível em: <<http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/7-3/007.pdf>> . Acesso em: 25 nov. 2019.

SANTOS, N. P. *et al.* Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INDEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. **Hum Mutat.**, v.31, n.2, p.184-190, 2010.

SANTOS, DE S. A.; LOBO, L. L. **Ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona em cães assintomáticos com doença mixomatosa valvular mitral.** 2012. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Lusófona, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2012.

SOLÉ, X. *et al.* SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. **Bioinformatics**, v.22, n. 15, p. 1928-1929, 2006.

- STERI, M.; IDDA, L. M.; WHALEN, M. B.; ORRU, V. Genetic variants in mRNA untranslated regions. **WIREs RNA**, v. 9, n. 4, p. e1474, 2018.
- STROMBERG, A.; MARTENSSON, J. Gender differences in patients with heart failure. *Eur J Cardiovasc Nurs*, v. 2, n. 1, p. 7-18, 2003.
- SU, X. *et al.* Association Between Angiotensinogen, Angiotensin II Receptor Genes, and Blood Pressure Response to an Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor. **Circulation**, v.116 n.6, p. 725-732, 2007.
- SWEENEY, R.; FAN, Q.; YAO, M. C. Antisense ribosomes: rRNA as a vehicle for antisense RNAs. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, n. 16, p. 8518-8523, 1996.
- TARDIN, O. M. *et al.* Genetic polymorphism G894T and the prognosis of heart failure outpatients. **Arq Bras Cardiol**, v. 101, n. 4, p. 352-358, 2013.
- TAFRIHI, M.; HASHEMINASAB, E. MiRNAs: Biology, Biogenesis, their Web-based Tools, and Databases. **MicroRNA**, v. 8, n. 1, p. 4-27, 2019.
- TAKEUCHI, F. *et al.* Reevaluation of the association of seven candidate genes with blood pressure and hypertension: a replication study and meta-analysis with a larger sample size. **Hypertension Research**, v.35, n. 8, p. 825-831, 2012.
- TELENTI, A. *et al.* Deep sequencing of 10,000 human genomes. **PNAS**, v. 113, n. 42, p. 11901-11906, 2016.
- TIAN, C. *et al.* A genome wide single-nucleotide-polymorphism panel with high ancestry information for African American admixture mapping. **Am J Hum Genet.**, v. 79, n. 4, p. 640-649, 2006.
- TIFFIN, N. *et al.* Computational Analysis of Candidate Disease Genes and Variants for Salt-Sensitive Hypertension in Indigenous Southern Africans. **Plos One**, v. 5, n. 9, e12989, 2010.
- UNTERGASSER, A *et al.* Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, n. 15, p. e115, 2012.
- VAN DER VELDEN, A.W; THOMAS, A. A. The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 31, n. 1, p.87-106, 1999.
- VELLOSO, M. W. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism in a multi-ethnic population with heart failure and controls. **Nitric Oxide**, v. 22, n. 3, p. 220-225, 2010.
- VINKHUYZEN, A. *et al.* Estimation and partition of heritability in human populations using whole-genome analysis methods. **Annu Rev Genet.**, v. 47, p. 75-95, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23988118> > . Acesso em: 25 nov. 2019.



XUN, L. *et al.* Renin–angiotensin–aldosterone system gene polymorphisms in gestational hypertension and preeclampsia: A case–control gene-association study. **Scientific Reports**. v. 6, n. 38030, p. 1-8, 2016.

WATKINS, W. S. *et al.* Genotype-phenotype analysis of angiotensinogen polymorphisms and essential hypertension: the importance of haplotypes. **J Hypertens.**, v. 28, n. 1, n. 65-75, 2010.

WEBER, K. T. Aldosterone in Congestive Heart Failure. **N Engl J Med.**, v.345, n. 23, p. 1689-1697, 2001.

WEIR, R. A. P. *et al.* Aldosterone and cortisol predict medium-term left ventricular remodelling following myocardial infarction. **Eur J Heart Failure**, v. 13, n. 12, p. 1305-1313, 2011.

WHITE, P. C. Aldosterone synthase deficiency and related disorders. **Mol Cell Endocrinol.**, v.217, n.1-2, p.81-87, 2004. Review.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cardiovascular diseases (CVDs). 2016. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>. Acesso em: 08 nov. 2019.

ZAHER, A. M. E.; ALI, S. M. R. Angiotensin II Contributes to the Pathophysiology of Heart Failure. **OAJPR**, v. 2, n. 4, p. 1-6, 2017.

ZIAEIAN, B.; FONAROW, G. C. Epidemiology and aetiology of heart failure. **Nat Rev Cardiol.**, v. 13, n. 6, p. 368–378, 2016.

**ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pedro Ernesto para amostras de pacientes com IC-I**



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**




Rio de Janeiro, 16 de dezembro de 2009

Do: Comitê de Ética em Pesquisa  
Prof. Wille Oigman  
Para: Aut. Felipe Neves de Albuquerque  
Orient. Prof<sup>a</sup>. Andréa de Araújo Brandão

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (2541-CEP/HUPE – CAAE: 0176.0.228.000-09) "AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS SOBRE A MORBIDADE E MORTALIDADE CARDIOVASCULARES EM PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA DE ETIOLOGIA NÃO-ISQUÊMICA", aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o termo de consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S<sup>a</sup>., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

  
Prof. Wille Oigman  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
HUPE/PE/UE

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030  
TEL: 21 2587-6353 – FAX: 21 2264-0853 - E-mail: cep-hupe@uerj.br

**ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pedro Ernesto para pacientes com IC-NI**



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**




Rio de Janeiro, 16 de dezembro de 2009

Do: Comitê de Ética em Pesquisa  
Prof. Wille Oigman  
Para: Aut. Gustavo Salgado Duque  
Orient. Prof<sup>a</sup>. Dayse Aparecida da Silva

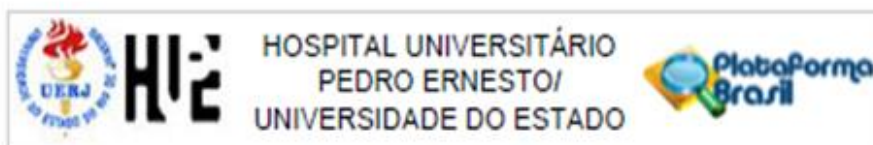
O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (2549-CEP/HUPE - CAAE: 0175.0.228.000-09) "AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DO POLIMORFISMO GENÉTICO NO PROGNÓSTICO E RESPOSTA TERAPÊUTICA EM PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA DE ETIOLOGIA ISQUÊMICA", aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o termo de consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. Sa., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

  
Prof. Wille Oigman  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
HUPE/UERJ

ANEXO C - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pedro Ernesto para amostras controles



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Polimorfismos genéticos do metabolismo lipídico, variáveis pressóricas, antropométricas e laboratoriais em indivíduos jovens

**Pesquisador:** Rossana Ghesa Andrade de Freitas

**Área Temática:** Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada adma.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 12144313.8.0000.5259

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 293.134

**Data da Relatoria:** 15/05/2013

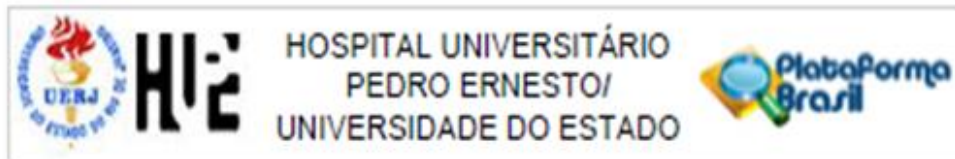
**Apresentação do Projeto:**

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morte no mundo, dados publicados pela ONU em 2011 revelam que das 57 milhões de mortes ocorridas no mundo no ano de 2008, 17 milhões foram devidas as DCVs, isto corresponde a 48% de todas as mortes ocorridas no mundo. No Brasil, as DCVs concentram 29,4% do total de óbitos declarados no ano de 2007, segundo dados da Saúde Brasil. Diante destes dados, a detecção precoce de indivíduos de alto risco e o estabelecimento de estratégias de prevenção é de fundamental importância para a redução dos índices de morbidade e mortalidade e todos os esforços devem ser feitos para prevenir o primeiro evento cardiovascular, pois ele pode ser fatal, incapacitante, além de representar um alto custo com cuidados médicos. No entanto, os maiores desafios atualmente estão relacionados com o estabelecimento de critérios que permitam determinar novos marcadores de risco que possam ser incorporados a prática clínica.

**Objetivo da Pesquisa:**

Determinar a relação entre variáveis clínicas, antropométricas, laboratoriais e polimorfismos genéticos do metabolismo lipídico em indivíduos jovens

**Endereço:** Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo  
**Bairro:** Vila Isabel **CEP:** 20.551-030  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)2666-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 203.134

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** De acordo com a metodologia proposta, entende-se que não há risco nenhum associado a condução deste projeto em relação aos indivíduos avaliados e estudados. O único desconforto está relacionado à retirada de sangue venoso, entretanto, esta técnica é utilizada usualmente na prática clínica.

**Benefícios:** Os benefícios deste estudo relacionam-se com o conhecimentos destes polimorfismos na população brasileira, associados às contribuições para detecção precoce de alterações no metabolismo lipídico e de doenças cardiovasculares em indivíduos jovens, baseado nos dados laboratoriais das frações lipídicas estudadas e na análise genética dos polimorfismos realizadas no presente estudo que irá possibilitar uma intervenção precoce e preventiva, possibilitando um menor tempo de internação e menor gasto em saúde.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto está condizente com boas práticas em pesquisa

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE foi alterado corretamente

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto está apto para sua realização.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas. 2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. 3. O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo  
 Bairro: Vila Isabel CEP: 20.551-030  
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
 Telefone: (21)2866-8253 Fax: (21)2264-0853 E-mail: cep-hupe@uerj.br

## ANEXO D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
Faculdade de Ciências Médicas  
Hospital Universitário Pedro Ernesto  
Serviço/Disciplina de Cardiologia  
Setor de Hipertensão Arterial e Lípidos  
Laboratório de Diagnósticos por DNA**

### **Consentimento Informado**

#### **1- Afirmação Introdutória**

Você está sendo convidado a participar de um estudo de investigação clínica e genética. Para decidir se você deseja ou não participar, você precisa entender as vantagens e desvantagens do mesmo, para poder formar a sua opinião.

#### **2- Objetivo do Estudo**

Embora tenha havido muitos avanços no diagnóstico e tratamento das doenças cardiovasculares, elas ainda permanecem como causa de grande morbidade e mortalidade em vários países, inclusive o Brasil, sendo uma causa comum de afastamento do trabalho ou mesmo de aposentadoria precoce. Considerável soma de recursos estão destinadas em todo o mundo, para pesquisas e programas científicos com o objetivo máximo de identificar, controlar e prevenir estas doenças.

Uma das formas de fazer esta prevenção é identificar desde cedo certas condições, chamadas de fatores de risco cardiovascular, que aumentam a chance das pessoas de terem angina ou infarto, derrame, ou outros problemas do coração e da circulação. São eles: pressão alta, diabetes ou açúcar alto no sangue, excesso de peso, problemas de colesterol alto e outros hábitos como má alimentação, fumar ou usar bebida alcoólica além de não praticar atividade física. Além disso, sabemos hoje que estes fatores de risco costumam estar presentes em vários membros da mesma família, o que quer dizer que se você ou algum parente seu tem alguma dessas anormalidades, as outras pessoas da sua família também poderão ter essas mesmas doenças.

Com o objetivo de esclarecer alguns destes fatores de risco, estamos convidando você, para comparecer ao Hospital Universitário Pedro Ernesto e realizar avaliações clínicas e exame de sangue. Depois de toda a avaliação, podemos saber se você tem algum problema no coração ou alguma dessas anormalidades que poderão causar esses problemas, no futuro. Na visita médica aqui no Hospital, serão feitos a medida da pressão arterial e verificação do seu peso, de sua altura, a medida da sua cintura, além da coleta de sangue para dosar as gorduras: colesterol, HDL, LDL e triglicérides, além de lipoproteínas (apolipoproteína A e apolipoproteína B e lipoproteína A). O sangue também será utilizado para realizar exames em genes relacionados às gorduras (colesterol, HDL, LDL, triglicérides e lipoproteínas). Nesta avaliação, não serão administrados medicamentos. Depois do resultado dos exames, caso seja necessário e de seu interesse, você poderá realizar o tratamento no Serviço de Cardiologia deste hospital, ou levar os exames para o seu médico particular.

Além disso, você saberá como está a sua saúde cardiovascular geral e a prática de hábitos saudáveis de vida poderá ser adotada.

### **3- Procedimentos Médicos a Serem Seguidos**

Após ler, entender e concordar, você assinará o Consentimento Informado, e somente depois, os médicos irão examinar você e colher o seu sangue para os exames laboratoriais. Se você estiver tomando algum remédio prescrito pelo seu médico, eles deverão ser mantidos, ou, a critério do seu médico, poderão ser modificados no futuro, de acordo com o resultado de seus exames. A avaliação constará de uma visita médica, onde serão realizados o exame clínico, antropométrico e a coleta de sangue. Após esta visita, você terá acesso a todos os resultados e poderá ser acompanhado aqui no Hospital Pedro Ernesto ou levar estes resultados para seu médico particular.

### **4- Desconfortos e Riscos**

Nenhum novo medicamento ou forma de tratamento será testado em você e o único desconforto será o da coleta de sangue, através da punção do sangue de sua veia, como é feito habitualmente.

### **5- Exclusões**

Se você não entender alguma palavra do texto, peça explicações ao médico que o está atendendo. Se não for da sua vontade, você não tem obrigação de participar do estudo.

### **6- Benefícios aos participantes**

As doenças do coração são a principal causa de morte no nosso país e no mundo. Várias são as situações que, quando presentes, aumentam o risco do indivíduo ter um problema do coração: pressão alta, diabetes, colesterol elevado, fumo, obesidade, falta de exercício físico são algumas das mais conhecidas. Estas condições são reconhecidas hoje como os fatores de risco cardiovascular. Hoje se sabe que, quanto mais cedo estes fatores são identificados, mesmo que a pessoa não sinta nada, maior o benefício que esta pessoa terá com o tratamento imediato.

Ao participar de estudos como este, você estará colaborando para que um maior conhecimento médico e científico em nosso país seja alcançado. Além disso, você estará realizando uma revisão ampla da sua saúde cardiovascular e em sendo encontrada alguma anormalidade, você será devidamente informado, e as orientações médicas serão fornecidas.

É possível também que nos indivíduos, onde os fatores de risco cardiovascular estão mais presentes, sejam identificados e possam ser alertados para mudanças nos seus hábitos, com vistas à prevenção das doenças do coração.

### **7- Dados confidenciais**

A menos que sejam requeridos por lei, apenas o investigador, o comitê de revisão e a comissão de ética terão acesso aos dados confidenciais que identificam você pelo nome. Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou em publicações; no entanto, você não será identificado nestas apresentações. Todo o material biológico coletado neste estudo será exclusivamente utilizado para as pesquisas dos fatores de risco cardiovascular e avaliação genética. Qualquer outro exame a ser realizado com este material será solicitado novo consentimento, informando detalhadamente o fim a que se destina.

**8- Novas descobertas**

Se no decorrer deste estudo ou ao seu final, surgir alguma conclusão relevante para seu benefício, você será informado a respeito.

**9- Pessoas para contato**

O pesquisador ou seu substituto responderá a todas as perguntas. Se você tiver questões adicionais no decorrer deste estudo sobre a pesquisa ou seus direitos como um participante da pesquisa, poderá dirigi-las à Rossana Ghessa Andrade de Freitas, ou Dra. Maria Eliane Magalhães no setor de Hipertensão Arterial e Lípidos da Cardiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, tel: (21) 2587-6482 ou Dra. Dayse Aparecida da Silva no Laboratório de Diagnósticos por DNA da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, tel: (21) 2334-0594.

**10- Participação voluntária**

Você está participando voluntariamente deste estudo. Você pode se recusar a participar do mesmo a qualquer momento, sem penalidades nem perda dos benefícios a que você já tem direito.

Li o texto acima e estou ciente do conteúdo deste formulário de consentimento. Minhas perguntas foram respondidas. Consinto voluntariamente em participar. Recebi uma cópia deste formulário de consentimento.

Este termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CEP/HUPE) e qualquer dúvida pode-se entrar em contato através do endereço: CEP/HUPE: CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA. AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030. Ou pelo telefone: (21) 2868-8253, ou através do e-mail: cep-hupe@uerj.br.

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Nome do investigador: \_\_\_\_\_


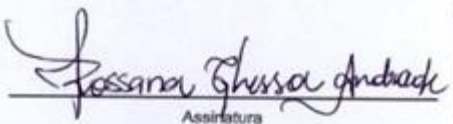
Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Nome da testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_



ANEXO E - Documento do Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (SISNEP)

 MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP <b>FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS</b>			
1. Projeto de Pesquisa: Polimorfismos genéticos do metabolismo lipídico, variáveis pressóricas, antropométricas e laboratoriais em indivíduos jovens		2. Número de Sujeitos de Pesquisa: 300	
3. Área Temática: Área 1. Genética Humana. (Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.)			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Rossana Ghesa Andrade de Freitas			
6. CPF: 007.642.354-94		7. Endereço (Rua, n.º): AUGUSTA CANDIANI CAMPO GRANDE 95, bl 09, apto 101 RIO DE JANEIRO RIO DE JANEIRO 23070020	
8. Nacionalidade: BRASILEIRA		9. Telefone: (21) 8639-9342	10. Outro Telefone:
		11. Email: rghessa@yahoo.com.br	
12. Cargo:			
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.</p>			
Data: <u>21</u> / <u>12</u> / <u>2012</u>		 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
13. Nome: Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ		14. CNPJ: 33.540.014/0017-14	15. Unidade/Órgão: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ
16. Telefone: (21) 1587-6353		17. Outro Telefone:	
<p>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p>			
Responsável: _____		CPF: _____	
Cargo/Função: _____			
Data: _____ / _____ / _____		_____	
		Assinatura	
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.			